

TARTU ÜLIKOOL

MEDITSIINITEADUSTE VALDKOND  
BIO- JA SIIRDEMEDITSIINI INSTITUUT  
IMMUNOLOOGIA OSAKOND

LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND  
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT  
EVOLUTSIOONILISE BIOLOOGIA ÕPPETOOL

**ZnT8 autoantikehad esimest tüüpi  
diabeedi haigetel ja nende määramine seerumis kasutades  
ensüümvahendatud immuunsorptsioonmeetodit**

Magistritöö

40 EAP

Janet Tamm

Juhendaja: PhD Meeme Utt

Kaasjuhendaja: MSc Jüri Parik

TARTU 2018

## INFOLEHT

**Lühikokkuvõte.** Esimest tüüpi diabeet (T1D) on autoimmuunhaigus, mis tekib endokriinse pankrease beetarakkude hävitamise tulemusena. Haiguse tekkel ja progresseerumisel on olulised pankrease saarte vastased autoantikehad. Üheks tuntuimaks esimest tüüpi diabeedi korral on tsinktransporter 8 vastane autoantikeha. Käesoleva magistritöö ülesandeks oli välja selgitada lühikese 18 aminohappe pikkuse ja peamisele epitoobile vastava peptiidi kasutamise võimalikkust ZnT8 IgG klassi kuuluvate autoantikehade tuvastamiseks. Uurimismeetodina kasutati ensüümvahendatud immuunsorptsioonmeetodit (ELISA-t). Saadud tulemusi võrreldi kliinilises praktikas kasutatava pikema peptiidiga. Statistiline analüüs teostati GraphPad Prism 7-ga ning saadud andmete põhjal määrati piirväärtus, millest kõrgemate väärtustega seerumid tähistati autoantikehi sisaldavateks. Saadud tulemusi võrreldi kliinilises praktikas kasutatava ElisaRSR™ ZnT8 Ab™ ning ZnT8A lutsiferaasi immunopretsipitatsiooni süsteemis tehtud testide tulemitest. Leiti, et 18 amino-happe pikkust ja positsioonis 325 arginiini sisaldavat (ah<sub>324</sub> – R<sub>325</sub> –...–ah<sub>341</sub>) peptiidi on võimalik kasutada ZnT8 autoantikehade määramiseks.

**Märksõnad:** esimest tüüpi diabeet, tsinktrasporter 8, autoantikeha, ZnT8A, ELISA.

**CERCS kood:** B500 (immunoloogia)

**Abstract.** Type 1 diabetes is an autoimmune disease, which develops as a result of destruction of endocrine pancreatic beta cells. It is known that there is a strong correlation between the presence of islet cells autoantibodies and development of type one diabetes. One of the most important autoantibodies for diagnosing type 1 diabetes are ZnT8 autoantibodies. In this master's thesis the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to assess how well the part of ZnT8 C-terminus, which is 18 amino acids long, is reconized by autoantibodies comparison with the longer 102 amino acid C-terminal sequence which is currently used in tests. GraphPad Prism 7 was used for statistical analysis. Based on results from statistical analysis a cutoff value was determined. The obtained results were compared with the results of the ElisaRSR™ ZnT8 Ab™ test, that is available on the market, and the ZnT8 luciferase immunoprecipitation system test. It was discovered, that a peptide, which is 18 amino acids long and contains arginine in position 325 can be used for determining ZnT8 autoantibodies.

**Keywords:** type 1 diabetes, zinc transporter 8, autoantibody, ZnT8A, ELISA.

**CERCS kood:** B500 (immunology)

## **SISUKORD**

<b>INFOLEHT .....</b>	<b>2</b>
<b>SISUKORD .....</b>	<b>3</b>
<b>KASUTATUD AKRONÜÜMID JA LÜHENDID .....</b>	<b>6</b>
<b>SISSEJUHATUS.....</b>	<b>8</b>
<b>1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....</b>	<b>9</b>
<b>1.1 Diabeedi üldiseloostus.....</b>	<b>9</b>
<b>1.2 Esimest tüüpi diabeedi riskifaktorid .....</b>	<b>9</b>
<b>1.3 Esimest tüüpi diabeedi iseloostus .....</b>	<b>11</b>
<b>1.4 Esimest tüüpi diabeedi tekkemehhanism .....</b>	<b>11</b>
<b>1.5 Esimest tüüpi diabeedi autoantikehad .....</b>	<b>13</b>
1.5.1 Pankrease saarekete vastased autoantikehad .....	15
1.5.2 Insuliini vastased autoantikehad .....	15
1.5.3 Glutamiinhappe dekarboksülaasi 65 kDa isovormi vastased autoantikehad .....	16
1.5.4 Insulinoomiga seotud valk 2-e vastased autoantikehad.....	17
1.5.5 Tsinktransporter 8 ja selle vastased autoantikehad .....	17
<b>1.6 Diagnostika esimest tüüpi diabeedi kindlakstegemiseks.....</b>	<b>20</b>
<b>1.7 Diagnostilised testid.....</b>	<b>21</b>
<b>1.8 ZnT8 autoantikehade tuvastamismeetodid .....</b>	<b>21</b>
<b>1.9 Ensüümvahendatud immuunsorptsioonmeetod.....</b>	<b>23</b>
<b>1.10 ZnT8 autoantikehade seos teiste diabeedivormidega.....</b>	<b>26</b>
<b>2. EKSPERIMENTAALNE OSA.....</b>	<b>29</b>
<b>2.1 Töö eesmärgid .....</b>	<b>29</b>
<b>2.2 Materjalid ja meetodid.....</b>	<b>30</b>
2.2.1 Uuringumaterjal ja valimi kirjeldus .....	30
2.2.2 Kasutatud reagentid ja aparatuur .....	30
2.2.3 Ensüümvahendatud immuunsorptsioonmeetodi optimeerimine .....	32
2.2.3.1 Plaadi otsene katmine peptiidiga .....	32
2.2.3.2 Peptiidi immobiliseerimine avidiini vahendusel .....	32

2.2.3.3 Mittespetsiifilise seondumise vähendamine.....	33
2.2.3.4 Kontsentratsiooni ja ilmutamisaja optimeerimine.....	33
2.2.4 Optimeeritud ensüümvahendatud immuunsorptsioonmeetod.....	34
2.2.5 Autoantikehade seondumise inhibeerimine.....	35
2.2.6 Statistilised analüüsid .....	35
<b>2.3 Tulemused .....</b>	<b>36</b>
2.3.1 Ensüümvahendatud immuunsorptsioonmeetodi optimeerimine.....	36
2.3.1.1 Plaadi otsene katmine peptiidiga .....	36
2.3.1.2 Peptiidi immobiliseerimine avidiini vahendusel .....	36
2.3.1.3 Mittespetsiifilise seondumise vähendamine.....	36
2.3.1.4 Kontsentratsioonide ja ilmutamisaja optimeerimine .....	38
2.3.2 Autoantikehade seondumise inhibeerimine .....	38
2.3.3 Statistilised analüüsid .....	40
2.3.4 ZnT8 IgG isotüüpi autoantikehade esinemise kokkulangemine testide ELISA A771 ja ELISA 2C tulemuste vahel .....	41
<b>2.4 Arutelu.....</b>	<b>43</b>
2.4.1 SAT1 on efektiivne blokeerija ELISA testides.....	43
2.4.2 Individuaalne kontroll igale seerumile .....	43
2.4.3 ZnT8 IgG isotüüpi autoantikehade esinemise kokkulangevuse erinevus ELISA A771 ja ELISA 2C tulemuste vahel.....	43
2.4.4. ZnT8 autoantikehade esinemise kokkulangemine ELISA A771 ja ElisaRSR™ ZnT8 Ab™ testi tulemuste vahel.....	44
2.4.5. ZnT8 autoantikehade esinemise kokkulangemine ELISA 2C ja ElisaRSR™ ZnT8 Ab™ testi tulemuste vahel .....	46
2.4.6. ZnT8 IgG isotüüpi autoantikehade kokkulangemine ELISA A771 ja LIPS testi tulemuste vahel .....	48
<b>2.5 Järeldused.....</b>	<b>51</b>
<b>KOKKUVÕTE.....</b>	<b>52</b>
<b>TÄNUAVALDUSED .....</b>	<b>55</b>
<b>KIRJANDUSE LOETELU.....</b>	<b>56</b>
<b>KASUTATUD VEEBIAADRESSID .....</b>	<b>66</b>

<b>LISAD .....</b>	<b>67</b>
<b>LISA 1. Kasutatud lahused.....</b>	<b>67</b>
<b>LISA 2. ROC-kõverad .....</b>	<b>69</b>
<b>LIHTLITSENTS.....</b>	<b>70</b>

## KASUTATUD AKRONÜÜMID JA LÜHENDID

<b>AUC</b>	kõveraalne pindala (ingl <i>area under curve</i> )
<b>APC</b>	antigeeni esitavad rakud (ingl <i>antigen presenting cell</i> )
<b>BSA</b>	veise seerumi albumiin (ingl <i>bovine serum albumin</i> )
<b>CO</b>	piirväärtus (ingl <i>cutoff</i> )
<b>ELISA</b>	ensüümvahendatud immuunsorptsioonmeetod (ingl <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> )
<b>GAD65</b>	glutamiinhappe dekarboksülaasi isovorm 65 (ingl <i>glutamic acid decarboxylase isoform 65</i> )
<b>GAD65A</b>	GAD65-vastased autoantikehad (ingl <i>GAD65 autoantibodies</i> )
<b>HRP</b>	mädarõika peroksüdaas (ingl <i>horseradish peroxidase</i> )
<b>IA-2</b>	insulinoomiga seotud valk 2 (ingl <i>insulinoma-associated protein</i> )
<b>IA-2A</b>	insulinoomiga seotud valk 2-e vastased autoantikeha (ingl <i>insulinoma-associated protein-2 antibodies</i> )
<b>IAA</b>	insuliini vastased autoantikehad (ingl <i>insulin autoantibodies</i> )
<b>ICA</b>	pankrease saarekeste vastased autoantikehad (ingl <i>islet cell autoantibodies</i> )
<b>IFN</b>	interferoon (ingl <i>interferon</i> )
<b>LIPS</b>	lutsiferaasi immunopretsipitatsiooni süsteem (ingl <i>luciferase immunoprecipitation system</i> )
<b>LADA</b>	latentne autoimmuunne täiskasvanute diabeet (ingl <i>latent autoimmune diabetes in adults</i> )
<b>LS</b>	lümfisõlm (ingl <i>lymph node</i> )

<b>LR</b>	tõenäosuste suhe (ingl <i>likelihood ratio</i> )
<b>MHC</b>	peamine koesobivusantigeen, mida inimesel tähistatakse lühendiga HLA (ing major <i>histocompatibility complex, what in people is celebrated HLA</i> )
<b>PBS</b>	fosfaatpuhverdatud soolalahus (ingl <i>phosphate-buffered saline</i> )
<b>PBS-T</b>	fosfaatpuhverdatud soolalahus koos Tween 20-ga (ingl <i>phosphate-buffered saline with Tween 20</i> )
<b>PBS-T-NaCl</b>	fosfaatpuhverdatud soolalahus koos Tween 20 ja naatriumkloriidiga (ingl <i>phosphate-buffered saline with Tween 20 and sodium chloride</i> )
<b>T1D</b>	esimest tüüpi diabeet (ingl <i>type 1 diabetes</i> )
<b>T2D</b>	teist tüüpi diabeet (ingl <i>type 2 diabetes</i> )
<b>SNP</b>	üksiku nukleotiidi polümorfism (ingl <i>single nucleotide polymorphism</i> )
<b>ZnT8</b>	tsinktransporter 8 (ingl <i>zinc transporter 8</i> )
<b>ZnT8A</b>	tsinktransporter 8 vastane autoantikeha (ingl <i>zinc transporter 8 autoantibody</i> )
<b>ZnT8QA</b>	tsinktransporter 8 postsioonis 325 glutamiini vastane autoantikeha (ingl <i>zinc transporter 8 position 325 glutamine autoantibody</i> )
<b>ZnT8RA</b>	tsinktransporter 8 postsioonis 325 arginiini vastane autoantikeha (ingl <i>zinc transporter 8 position 325 arginine autoantibody</i> )
<b>ZnT8WA</b>	tsinktransporter 8 postsioonis 325 trüptofaani vastane autoantikeha (ingl <i>zinc transporter 8 position 325 tryptophan autoantibody</i> )

## SISSEJUHATUS

Esimest tüüpi diabeet on autoimmuunhaigus, mis tekib endokriinse pankrease beetarakkude hävimise tulemusena. See viib omakorda insuliini defitsiidini, mille tõttu tekib hüperglükeemia. Diabeeti haigestuvate inimeste, kaasa arvatud esimest tüüpi diabeeti põdevate, sagedus tõuseb jätkuvalt, seetõttu on üha olulisem tuvastada isikuid prediabeedi faasis ja väga varajases diabeedi tekkefaasis võimaldadamaks paremat haiguse ennetamist ja/või ravi. Aastaid enne esimest tüüpi diabeedi diagnoosimist on võimalik haigust ette ennustada pankrease beetarakkude vastaste autoantikehade tuvastamisega vereseerumist, kust on võimalik neid määrata ka pärast diabeedi diagnoosi kinnitamist.

Autoantikehad on kliinilises praktikas biomarkeriteks, mille kaudu on võimalik autoimmuunse haiguse esinemist hinnata. Üheks olulisemaks autoantikehaks diabeedi diagnostikas on tsinktransporter 8 vastane autoantikeha (ZnT8A). Alates tsinktransporter 8 (ZnT8) identifitseerimisest esimest tüüpi diabeedi autoantigeenina on välja töötatud teste vastava autoantikeha määramiseks. Autoantikehade tuvastamise testidel on tulevikuperspektiive nii autoimmuunhaiguste varajaseks avastamiseks kui ka haiguse tekke prognoosimiseks. Autoantikehadel põhinevate testide arendamisel on oluline määrata antigeeni epitoop, mille täpsem detekteerimine võimaldab teostada efektiivsemat analüüsi. Enamik ZnT8 autoantikehi tunneb ära valgu C-terminaalset otsa ja seda teadmist üritatakse rakendada diagnostiliste testide väljatöötamisel. Antigeenina kasutatakse enamjaolt kahte erinevat 102 aminohappe pikkust järjestust, mis on ühendatud siduva peptiidiga. Sellisel juhul on tegemist ZnT8 täispika valgu lühendatud järjestusega, mis vastab selle kahele C-terminaalsele otsale, kus algse aminohappelise järjestuse põhjal asub positsioonis 325 ühel juhul trüptofaan ja teisel juhul arginiin.

Käesoleva magistritöö ülesandeks oli ensüümvahendatud immuunsorptsioonmeetodit (ELISA-t) kasutades määrata, kui hästi on võimalik rakendada lühikest 18 aminohappe pikkust ja peamisele epitoobile (R<sub>325</sub>, R<sub>332</sub>, E<sub>333</sub>, K<sub>336</sub> ja K<sub>340</sub>) vastavat peptiidi ZnT8-ga interakteeruvate IgG isotüüpi autoantikehade tuvastamiseks esimest tüüpi diabeeti haigestunud isikutel. Saadud tulemusi võrreldi enamikes kommertsiaalsetes testides kasutatava pikema peptiidiga identsel meetodil teostatud katsete resultaatidega. Töö hõlmas tulemuste võrdlemist kliinilises praktikas kasutatava ElisaRSR™ ZnT8 Ab™ testi ning ZnT8A lutsiferaasi immunopretsipitatsiooni süsteemiga tehtud testi tulemustega. Käesoleva töö eksperimenaalne osa teostati Tartu Ülikooli meditsiiniteaduste valdkonna bio- ja siirdemeditsiini instituudi immunoloogia osakonnas.



## **1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE**

### **1.1 Diabeedi üldiseloostus**

Diabeet on metaboolsete haiguste grupp, mida iseloomustab hüperglükeemia, mis võib olla põhjustatud kas insuliini sekretsiooni, insuliini toime või mõlema defektist. Diabeedi krooniline hüperglükeemia on seotud erinevate organite pikaajaliste kahjustuste ja düsfunktsioonidega, mida on tähendatud eriti silmade, neerude, närvide, südame ja veresoonte puhul. (American Diabetes Association, 2014) Maailmas on diabeet diagnoositud umbes 415 miljonil inimesel ning Eestis on diabeeti haigestunud ligikaudu 70 000 indiviidi (Eesti Diabeediliit, 2018). Ameerika Diabeedi Assotsatsioon klassifitseerib diabeedi nelja kategooriasse:

1. I tüüpi diabeet, mis tekib beetarakkude autoimmuunse hävimise tõttu ja viib enamasti insuliini absoluutse puudumiseni;
2. II tüüpi diabeet, mille põhjuseks võib olla insuliini mõju nõrgenemine ehk insuliini-resistentsus või insuliini eritumise häire või mõlema põhjuse koosinemine;
3. gestatsioonidiabeet on diabeet, mis diagnoositakse teisel või kolmandal raseduse trimestril;
4. spetsiifilist tüüpi diabeetid, millel on näiteks järgnevad põhjused:
  - a) monogeneetiline diabeedi sündroom, sinna alla kuuluvad vastsündinu diabeet ja noorte küpsuseas algav diabeet;
  - b) eksokriinse kõhunäärme haigused, näiteks pankreatiit;
  - c) insuliini toime geneetilised defektid, näiteks lipoatroofne diabeet;
  - d) endokrinopaatiaid, mille alla kuulub näiteks akromegaalia;
  - e) ravimi või kemikaali poolt indutseeritud diabeet, näiteks glükokortikoidide kasutamine HIV-i/AIDS-i ravis või pärast organi transplatatsiooni;
  - f) infektsiooni tagajärjel, näiteks mõne tsütomegaloviiruste perekonda kuuluva viirusega nakatudes. (American Diabetes Association, 2014)

### **1.2 Esimest tüüpi diabeedi riskifaktorid**

T1D kujunemisel on olulised erinevad riskifaktorid, mille hulka kuuluvad vanus, sugu, rass, genotüüp ja geograafiline paiknemine ning ka sesoonsus. (Maahs jt. 2010).

Alla 20-aastaste seas on T1D peamine diabeedi tüüp ning selles vanusegrupis esineb seda  $\geq 85\%$  kõikidest diabeedi vormidest. Tavaliselt diagnoositakse haigus lastel või noorukitel, kuid haigus võib ilmneda ka täiskasvanutel. T1D esinemissagedus täiskasvanutel on madalam kui lastel, kuigi ligikaudu neljandik saavad diagnoosi täiskasvanutena. Haigestuda võib igas

vanuses, näiteks isegi hilistes 90-ndates. Kuni 10% esineb juhtumeid, kus diagnoositakse täiskasvanul teist tüüpi diabeet, kuid samas leitakse ka T1D-ga seotud autoantikehasid. (Maahs jt., 2010)

T1D patsientidest rohkem kui 85% puudub perekondlik seos haigusega, siiski väljendub geneetiline riskifaktor asjaoluga, et õvedel (tõenäosus 6%) on kõrgem risk haigestuda kui USA valgel elanikkonnal (tõenäosus 0,4%), seega on õdedel-vendadel 15 korda suurem tõenäosus haigestuda kui teistel. (Steck jt., 2010) Erimuna kaksikutel on riskiskoor 6%–10%, mis on suhteliselt sarnane võrreldes tavaliste õvedega. Eriti kõrge on riskiskoor ühemunakaksikute puhul, kus on see koguni kuni 50%. (Kumar jt., 1993; Redondo jt., 2008) T1D isa järeltulijal on poole kõrgem risk haigestuda kui diabeeti põdeva ema järglasel, tõenäosused on vastavalt 12% ja 6%, erinevus võib olla põhjustatud näiteks geeni vermimisest (Steck jt. 2005; Moore jt., 2001).

T1D esinemissagedus on riigiti erinev. 21 sajandi algul avaldatud uuringu põhjal diagnoosti Soomes see haigus 37 lapsel 100 000-st, samas kui Hiinas ja Venezuelas 1 patsiendil 1 000 000 inimese kohta. Eesti lastel oli T1D esinemissagedus 11 haiget 100 000 isiku kohta, mis on ~3,4 korda väiksem kui soomlastel, samas ~1,8 korda kõrgem kui lätlastel. (Karvonen jt., 2000)

T1D on polügeenne haigus, milles osalevad paljud erinevad lookused. (Concannon jt., 2009) Inimese koesobivusantigeenide (HLA-de) spekter on oluline T1D tekkel. Suurim geneetiline vastuvõtlikus on HLA klass II DR-DQ haplotüüpidel. (Erlich jt., 2008) Kõrgeim risk kulmineerub, kui lapsel on heterosügootne HLA-DR3/4 haplotüüp, saades ühelt vanemalt DR3 ja teiselt vanemalt DR4 variandi, ning kui selle lapse perekonnas esineb esimest tüüpi diabeeti haigestunud isikuid. Eelnevalt kirjeldatud juhul on lapsel 3 korda suurem tõenäosus haigestuda diabeeti võrreldes haigestumiskoriga kui perekonnas ei ole esimest tüüpi diabeeti põdevaid isikuid (Carmichael jt., 2003). HLA regioonile lisaks on oluline esimest tüüpi diabeedi tekkel ka teised geenid. T1D-ga seotud geene on leitud rohkem kui 40 erinevast lookusest. (Barrett jt., 2009) Diabeedi kujunemisel on olulised erinevad alleelsed variandid näiteks *CTLA4*, *ILR2A*, *PTPN22* geenides (Nisticò jt., 1996; Lowe jt., 2007; Bottini jt., 2004).

Sesoonsusel on oluline roll T1D kujunemisel. USA-s teostatud uurigust järeldati, et kevadel, eriti mais sündinud imikutel on suurenenud tõenäosus T1D tekkeks. Madalaim T1D risk on novembrist veebruarini sündinud lastel. Erinevus võib olla tingitud hooajast sõltuva päikesevalguse intensiivsusest põhjustatud erineva D-vitamiini hulga sünteesist ning samuti sesoonsusest sõltuvatest mikroorganismidest. (Kahn jt., 2009)

### 1.3 Esimest tüüpi diabeedi iseloomustus

Umbes 5–10% diabeeti haigestunudel on esimest tüüpi diabeet ning Eestis esineb see haigus ligikaudu 7000 inimesel (American Diabetes Association, 2014; Eesti Diabeediliit, 2018). Esimest tüüpi diabeet klassifitseeritakse kaheks: T1D 1A, mis on autoimmuunne ja esineb 70–90% esimest tüüpi diabeeti haigestunudest, ja T1D 1B, mis on idiopaatiline (American Diabetes Association, 2014; Atkinson jt., 2014). Käesolevas magistritöös käsitletakse T1D all selle haiguse autoimmuunset varianti.

T1D 1A on CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> vahendatud T-rakkudest sõltuv autoimmuunne vastus, mis hävitab Langerhansi saartekestes asuvaid pankrease beetarakke (Anderson jt., 2005). Beetarakkude vastased autoantikehad on tugevalt seotud esimest tüüpi diabeedi arenguga. Autoantikehad interakteeruvad ühe või mitme autoantigeeniga. (Pihoker jt., 2005) Täiskasvanutel on tavaliselt aeglasem beetarakkude hävimine kui imikutel või lastel. Lastel ja noorukitel võib haigus esmakordselt avalduda ketoatsidoosina. Täiskasvanutel esineb mõõdukas paastu hüperglükeemia, mis võib muutuda raskekujuliseks hüperglükeemiaks ja/või ketoatsidoosiks infektsiooni või stressi tagajärjel. (American Diabetes Association, 2017)

T1D 1B ehk idiopaatilise diabeedi etioloogia on hetkel ebaselge, kuigi teatakse, et tegemist on päriliku haigusega. Siia kategooriasse kuuluvad enamjaolt isikud Aafrikast ja Aasiast. Neil esineb episoodiline ketoatsidoos ning episoodide välisel ajal erineval määral insuliinipuudulikkus. Sellel diabeedivormil puudub seos HLA riskialleelidega ning samuti ei eksisteeri beetarakkude vastast autoimmuunsust. (American Diabetes Association, 2014)

### 1.4 Esimest tüüpi diabeedi tekkemehhanism

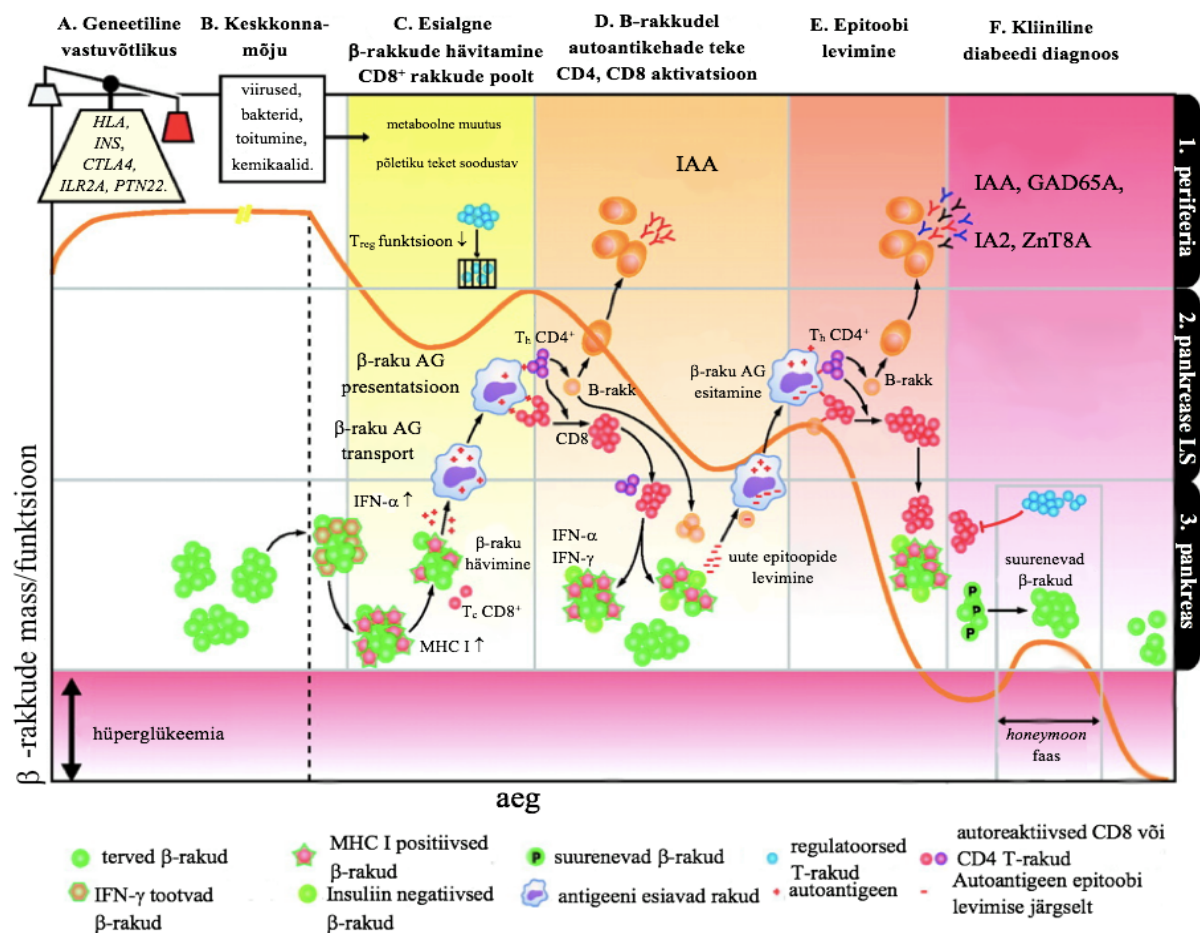
Hetkel ei teata esimest tüüpi diabeedi etioloogiat veel täielikult, aga mõistetakse, et T1D on autoimmuunhaigus, mille tekkimisel mängivad rolli nii geneetilised kui ka erinevad keskkonnafaktorid. Kindlad variandid nii *HLA* kui ka *CTLA4*, *ILR2A*, *PTPN22* geenides koos pankrease autoantikehadega moduleerivad esimest tüüpi diabeedi teket. (Nisticò jt., 1996; Lowe jt., 2007; Bottini jt., 2004; Barrett jt., 2009; Maziars jt., 2015)

Patoloogia tekkel on olulised pankrease saartega seostuvad autoantigeenid, mis ilmuvad aastaid enne haigust (Zhang jt., 2008; Zhang jt., 2011). Saarekestel ilmnevad lümfotsüütsed infiltraadid insuliidi tekkimisel, lisaks esinevad CD4<sup>+</sup> ja CD8<sup>+</sup> autoreaktiivsed beetarakkude vastased T-rakud nii kõrge riskiga isikutel kui ka diabeeti haigestunud isikutel (Han jt., 2013). Autoantikehade rollist patogeneesis teatakse, et CD4<sup>+</sup> T-abistajalümfotsüüt ja CD8<sup>+</sup> tsütotoksilised T-lümfotsüüdid on olulised T1D patogeneesis, kuna nende poolt algatatud

sündmused viivad autoreaktiivse vastuseni. Spetsiifiline autoantigeenide presentatsioon koosobivusantigeeni klass II molekulide poolt aitab kaasa patogeensete T-rakkude aktivatsioonile ja arvukuse kasvule. (Han jt., 2013)

Joonis 1 kirjeldab autoantikehade poolt vahendatud esimest tüüpi diabeedi teket. Inimesel diagnoositakse diabeet kui beetarakkude funktsioon langeb nn. roosasse tsooni, sellele eelneb aga palju erinevaid sündmusi, mis võivad jääda märkamatuks. Esimeseks mõjutajaks on geneetiline vastuvõtlikkus (a1), millele lisandub keskkonna tõuge (a2), need algatavad diabeedi arengu. Pankrease beetarakkudes toimub esmalt interferoon- $\alpha$  taseme (b3) ja seejärel raku pinnal MHC klass I molekulide ekspresiooni tõus (c3). Seetõttu  $CD8^+$  autoreaktiivsed T-rakud ründavad beetarakke, mis põhjustab antigeenide vabanemise. Antigeenid korjatakse üles antigeeni esitavate rakkude (APC) poolt ja viiakse pankrease lümfisõlme (LS) (c2). (Van Belle jt., 2011)

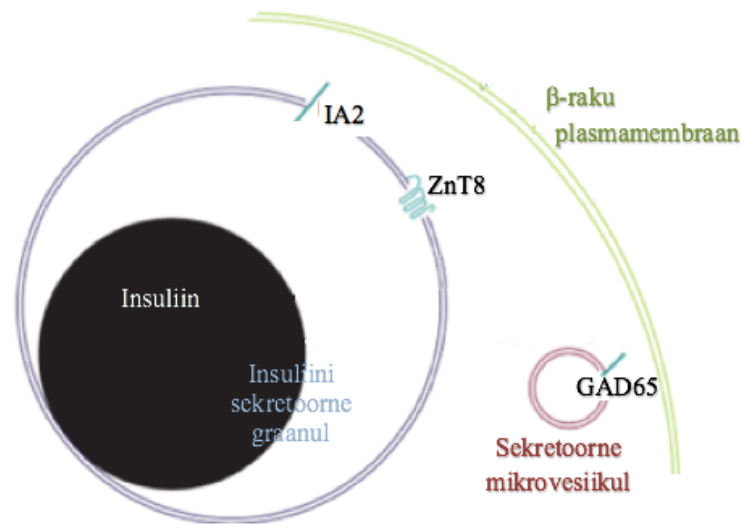
Viiruslik või bakteriaalne infektsioon, vale toitumine või teatud kemikaalidega kokkupuude ehk üldiselt keskkonnamõju on samal ajal perifeerias tekitanud metaboolse ümberlülituse (c1). Selline muutus viib põletikulise keskkonna tekkeni. Põletikulise keskkonna teke tingib reguloorsete T-rakkude funktsiooni pidurdamise. Beetarakkude antigeenid koostöös  $CD4^+$  T-abistajarakkudega algatavad põletikulises keskkonnas B-rakkude muutumise plasmarakkudeks ja insuliini autoantikehade ilmnemise, mida nimetatakse serokonversiooniks (d1). Autoreaktiivsed  $CD8^+$  T-rakud hakkavad prolifereeruma (d2) ja migreeruvad pankreasesse (d3). Autoreaktiivsed T-rakud põhjustavad beetarakkude hävimise (d3) teise laine kuna toodavad esmalt tsütokiini interferoon (IFN) gamma ja kasvaja nekroosifaktor alfa ning hiljem tsütolüütilist valku perforiini. Seetõttu lakkab osade beetarakkude võime toota insuliini. Toimub uute beetarakkude antigeenide vabanemine ja üleskorjamine APC-de poolt (d3) ning migreerumine pankrease LS-i (d3-d2). Selle tagajärjel rakenduvad uute omadustega  $CD4^+$  ja  $CD8^+$  T-rakud (e2) ja B-rakud (e1), seda nimetatakse epitoobi levimiseks. Järgnev beetarakkude hävitamislaine on selle tagajärjel raskem ja põhjustab beetarakkude massi ja funktsiooni olulist vähenemist (e2). Autoimmuunne põletik võib stimuleerida osade beetarakkude proliferatsiooni (f3) ja seetõttu nende mass ajutiselt taastub. Reguloorsed T-rakud võivad mõnikord põhjustada efektorvastuse (f3), mille tulemusel toimub beetarakkude hävitamine ja teisalt taastamine. Autoreaktiivne vastus on lõpuks tugevam ning kui funktsionaalseid beetarakke on alles jäänud 10–30% diagnoositakse esimest tüüpi diabeet. Diabeedi kliinilise diagnoosimise järgselt tekib ajutiselt iseseisev insuliini produktsioon, mida nimetatakse *honeymoon* faasiks (f3). (Van Belle jt., 2011)



**Joonis 1.** T1D tekkemehhanism. Beetarakkude massi ja funktsiooni muutus (oranž joon) enne diabeedi kliinilist määramist. Skeem on jaotatud tulpadeks (A-F), mis kirjeldavad etappe diabeedi kujundamisel, ja ridadeks vastavalt perifeeria, pankrease lümfisõlme äravool ja pankreas, mis tähistavad toimusmiskohta. (Van Belle jt., 2011, muudetud)

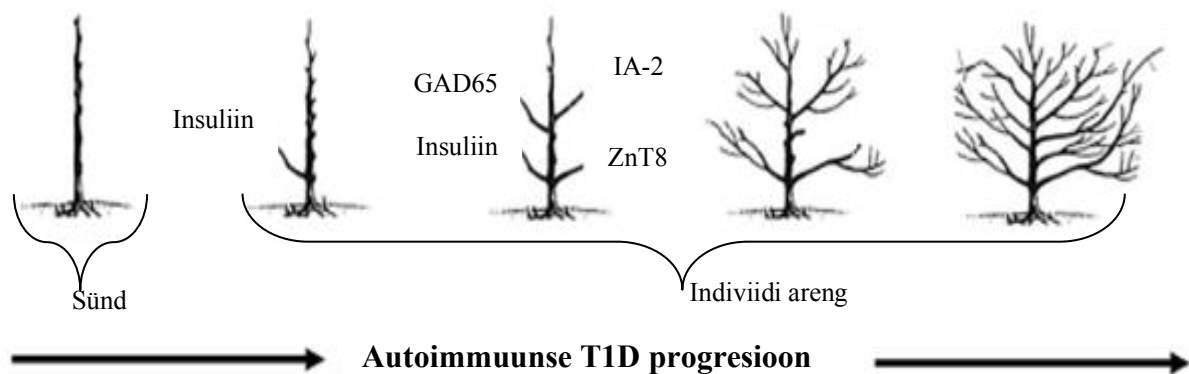
## 1.5 Esimest tüüpi diabeedi autoantikehad

Autoantikehad, mis seostuvad pankrease saarekeste beetarakkudele, ilmnevad tavaliselt prekliinilisel perioodil. Neid autoantikehasid saab kasutada markeritena T1D diagnoosimisel. (Lebastchi jt., 2012) Hetkel on avastatud viis põhilist autoantikeha: pankrease saarekeste vastased autoantikehad (ICA), insuliini vastased autoantikehad (IAA), glutamiinhappe dekarboksülaasi 65 kDa isovormi vastased autoantikehad (GAD65A), insulinoomiga seotud valk 2-e vastased autoantikehad (IA-2A) ja tsingi transporter 8 vastased autoantikehad (ZnT8A). (Bottazzo jt., 1974; Palmer jt., 1983; Baekkeskov jt., 1990; Rabin jt., 1994; Wenzlau jt. 2007) (joonis 2). Peamistele autoantikehadele lisaks teatakse ka, et pankrease kaksteistsõrmiksoole homeobox faktor 1 (PDX1), kromogranin A (CHGA) ja saarekeste amüloid polüpeptiid (IAAP) on seotud esimest tüüpi diabeediga (Li jt., 2010, Stadinski jt., 2010; Delong jt., 2011).



**Joonis 2.** Peamiste T1D autoantigeenide paikemine  $\beta$ -rakkudes. Sekretoorne graanul sisaldab eelkõige insuliini aga ka proinsuliini. Insuliini sekretoorse graanuli membraanis paiknevad ZnT8 ja IA-2. GAD65 paikneb sünapsi sarnase vesiikuli membraanis. (Arvan jt., 2012, muudetud)

Esimest tüüpi diabeedis on oluline roll autoantikeha poolt äratuntava antigeeni epitoobi levimisel. Epitoobi levimine algab kui autoimmuune protsess on pankreases käivitunud, mis omakorda viib antigeenide töötlemisele ja esitamisele. Selle väljenduseks on asjaolu, et lastel tekivad esmalt IAA-d ja haiguse kulgedes IA-2 ja GAD ja ZnT8 valke äratundvad autoantikehad (joonis 3). (Anaya jt., 2013; Morran jt., 2015)



**Joonis 3.** Epitoobide levimine T1D arengul. Puu tüvi kujutab endast sünnijärgse lapse immuunsüsteemi. Puu tüve kasvades tekivad oksad, millest igaüks sümboliseerib erineva autoantigeeni arengut T1D progresseerumisel. Puu kasvades toimub okste hargnemine, mis kujutab endast sama autoantikeha erineval küpsemisel tekkinud unikaalseid epitoope. T1D ilmsiks tulekul on puul väga palju harnenud oksa. (Morran jt., 2015, muudetud)

Risk haigestuda esimest tüüpi diabeeti kasvab võrdeliselt autoantikehade hulga suurenemisega. T1D põdevate inimeste sugulastel, kellel esinevad kaks või enam erinevat autoantikeha, on 39% tõenäosus esimest tüüpi diabeedi arenguks 3 aasta jooksul ja 68% tõenäosus sama haiguse tekkeks 5 aasta jooksul. T1D haige sugulasel, kellel leitakse 3 autoantikeha, on >90%-line tõenäosus haigestuda sellesse haigusesse 5 aasta jooksul. (Zhang jt., 2011) Samas on näidatud, et 10 aasta jooksul on 55,3 korda suurem tõenäosus haigestuda neil lastel, kellel esineb vähemalt üks autoantikeha võrreldes nendega, kellel ei esine ühtegi. Kui lapsel esineb kaks autoantikeha on tal 14,5 korda suurem risk haigestuda diabeeti kui lastel, kellel esineb üks autoantikeha. Haigestumisrisk on veel 3 korda suurem lastel, kellel on kolm autoantikeha võrreldes nendega, kellel on kaks. (Velluzzi jt., 2016) Analüüsidest ZnT8A-d koos IAA, GAD65A ja IA-2A-ga on võimalik autoimmuunsust kinnitada rohkem kui 96% äsja diagnoositud T1D patsiendil, ilma ZnT8A detektsioonita on võimalik tuvastada 86% diabeeti haigestunutest. (Wenzlau ja Hutton, 2013).

### **1.5.1 Pankrease saarekeste vastased autoantikehad**

Esmaseks sammuks 1. tüüpi diabeedi määratlemisel autoimmuunhaigusena oli pank-rease saarekeste vastaste autoantikehade tuvastamine immuofloresentsmeetodil inimese külmutuslõikudelt 1974. aastal. Need autoantikehad esinevad 70% esmadiagnoositud esimest tüüpi diabeeti põdevatel patsientidel. (Bottazzo jt., 1974) Vaatamata sellele, et on lihtsamini interpreteeritavaid diagnostilisi teste GAD65A, IA-2A, IAA ja ZnT8A tuvastamiseks, analüüsitakse laborites veel ICA-d. Teatud juhtudel annab ICA test positiivse tulemuse, kuigi eelnevalt on näidatud, et isikutel ei esine ei GAD65A, IA-2A, IAA ega ka ZnT8A-d. Seetõttu on oluline uurida ICA esinemist T1D patsientidel ka juhul, kui teisi autoantikehasid ei tuvastata. (Andersson jt., 2014) Tänapäeval ei kasutata ICA määramiseks inimese pankrease lõike vaid teiste imetajate, näiteks firma Euroimmun rakendab ahvi kõhunääret.

### **1.5.2 Insuliini vastased autoantikehad**

1983. aastal leiti insuliini vastased autoantikehad (Palmer jt., 1983). Nende autoantikehade esinemise puhul on täheldatud korrelatsiooni vanusega. Tavaliselt ilmuvad IAA umbes 1–2 vanustel lastel ning on esimesed pankrease vastased autoantikehad, mida on võimalik tuvastada. Kõige rohkem leiab neid lapseas ning pärast noorukiiga on nende esinemise sagedus madalam. (Vardi jt., 1988) Insuliini vastaseid autoantikehi on leitud 40–70% T1D põdevatel lastel (Chmiel jt., 2015). IAA seondub konformatsiooniliste epitoopidega ja ei reageeri denatureeritud

või fragmenteeritud antigeenidega. Peamsed aminohappejäägid, mis seonuvad kõrge afiinsusega IAA-ga on insuliini A ahela aminohappejäägid 8–13, samas kui madalaimat afiinsust on näidanud B ahela jäägid 28–30 (Lampasona ja Liberati, 2016). Hiljutine uuring näitab, et äsja diagnoositud esimest tüüpi diabeeti põdevatel täiskasvanutel on insuliini autoantikehade tase pöördvõrdeliselt seotud insuliini tundlikkusega. Madala insuliini tundlikkusega isikuid nimetatakse ka kui insuliini resistentseid. Seetõttu näitab insuliini autoantikehade kõrge tiiter võimalikku insuliini resistentust. (Burkart jt., 2018)

### **1.5.3 Glutamiinhappe dekarboksülaasi 65 kDa isovormi vastased autoantikehad**

1990. aastal avastati glutamiinhappe dekarboksülaasi 65 kDa isovormi vastased autoantikehad (Baekkeskov jt., 1990). GAD65A-sid peetakse kõige enam levinud autoantikehadeks T1D-s ja neid esineb 50–80% haigestunutest (Sabbah jt., 1999; Winter jt., 2002). Autoantikehad võivad ära tunda kolme erinevat GAD65-e piirkonda. GAD65A-d seonduvad kas N-terminaalse domeeniga, tunnevad 5'fosfaadi kofaktori sidumiskohta või interakteeruvad C-terminaalse domeenga (Piquer jt., 2005; Bonifacio jt., 2000). Glutamiinhappe dekarboksülaasi 65 kDa vastaseid autoantikehasid on võimalik tuvastada kasutades ELISA-t, LIPS-i ja elektrokemoluminestsentsi (Brooking jt., 2013; Marcus jt., 2011; Miao jt., 2013). GAD65A võivad esineda ka esimest tüüpi diabeedi puudumisel. Need autoantikehad on seotud erinevate haigustega, mille alla kuuluvad näiteks jäiga inimese sündroom (*stiff man syndrome*), X-seoseline immuunne düsregulatsioon, polüendokrinopaatia ja enteropaatia sündroom (*immunodysregulation polyendocrinopathy enteropathy X-linked syndrome*) ja autoimmuunne polüendokriinne sündroom (*autoimmune polyendocrine syndrome*) (Solimena jt., 1988; Lampasona jt., 2013; Söderbergh jt., 2004). Glutamiinhappe dekarboksülaasi 65 kDa isovormi vastaseid autoantikehasid ja C-peptiidi kombinatsiooni kasutatakse erinevate diabeedivormide eristamiseks. GAD65A olemasolu ja C-peptiidi madalat taset peetakse T1D näitajateks (Siraj jt., 2018). GAD65A peetakse ka latentse täiskasvanuea autoimmuunse diabeedi (LADA) markeriks (Buzzetti jt., 2007). Mõnikord tuvastatakse see autoantikeha teist tüüpi diabeediga patsientidel koos madala C-peptiidi tasemega, sellel juhul on tegemist LADA-ga. (Siraj jt., 2018)



### 1.5.4 Insulinoomiga seotud valk 2-e vastased autoantikehad

1994. aastal kirjeldati T1D autoantigeenina järgmine valk, mis on insulinoomiga seotud valk 2-e ehk türosiin fosfataasi sarnane valk, varasemalt nimetatud ka kui ICA512 (Rabin jt., 1994; Lan jt., 1994; Payton jt., 1995). See valk lokaliseerub  $\beta$ -rakkude insuliini sekretoorsete graanulite membraanidel (Ziegler jt., 1999). IA-2 sisaldab signaalpeptiidi (ah<sub>1</sub>–ah<sub>24</sub>), ekstratsellulaarset (ah<sub>25</sub>–ah<sub>576</sub>), transmembraanset (ah<sub>577</sub>–ah<sub>600</sub>) ja intratsellulaarset (ah<sub>601</sub>–ah<sub>979</sub>) osa. (Torii, 2009) 32–75% äsja diagnoositud T1D patsientidel esineb IA-2 vastane autoantikeha (Genovese jt., 1996; Gorus jt., 1997). T1D patsientide seerumis olevad IA-2 vastased autoantikehad interakteeruvad kas karboksüterminaalsete aminohapetega 771–979 või aminoterminalse intratsellulaarse domeeniga (Leslie jt., 1999; Morran jt., 2010). IA-2 ekstratsellulaarse domeeniga interakteeruvaid (ah<sub>1</sub>–ah<sub>577</sub>) autoantikehi seostatakse T1D kiirema arenguga (Morran jt., 2010). Teada on kaks erinevat IA-2 epitoopt. Üks tunneb ära lineaarse tsütoplasmaatilise membraani lähedase piirkonna. Selliseid on kaks, membraani lähedase piirkonna epitoopt 1, kuhu kuuluvad aminohappejäägid 611–620, ja membraani lähedase piirkonna epitoopt 2, kus on olulised aminohapped 621–630 (Bearzatto jt., 2002). Teine epitoopt hõlmab türosiinfosfataasi ja on konformatsiooniline (Dromey jt., 2004).

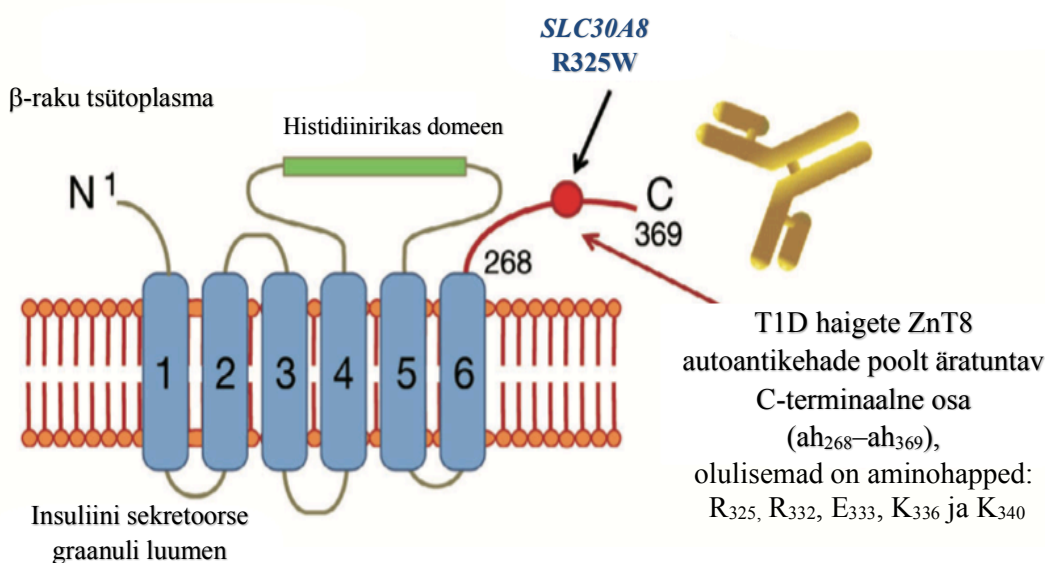
### 1.5.5 Tsinktransporter 8 ja selle vastased autoantikehad

Tsinktransporter 8 identifitseeriti 2007. aastal kui peamine autoantigeen esimest tüüpi diabeedis (Wenzlau jt., 2007). ZnT8 on iseloomulik pankreases Langerhansi saarekestes asuvatele  $\beta$ -rakkudele, kus selle valgu kontsentratsioon on suurim kogu organismis. Tsinktransporter 8 on geeni *SLC30A8* produkt, mille üleekspresioon  $\beta$ -rakkudes viib suurenenud insuliini nõristusele ja alla reguleerimine insuliini sensibiliseerimisele ning võimaliku glükoositalumatusele (Chimienti jt. 2006; Nicolson jt., 2009).

ZnT8 kuulub SLC30 perekonna valkude hulka ja on 369 aminohappe pikkune imetajates kõrgelt konserveerunud transmembraane valk. Valku kodeeriv *SLC30A8* geen asub kromosoomis 8 positsioonis q24.11. (Seve jt., 2004) ZnT8 koosneb kuuest transmembraanist domeenist moodustades membraanipoori, kus N- ja C-terminaalsed domeenid asuvad tsütosoolis. Tsütosooli poolses osas asub ka histidiinirikas domeen, mis seob tsiingi ioone. Valgu ülesandeks on tsiingiioonide transport tsütoplasmast insuliini sekretoorsesse graanulisse, kus kaks Zn<sup>2+</sup> iooni moodustavad kompleksi insuliini heksameeriga. (Chimienti jt., 2004) Tsinktrasnporter 8 ehitust insuliini sekretoorse graanuli membraanil kirjeldab joonis 4. Leitud

on, et ZnT8 ekspresiooni reguleerivad alla näiteks tsütokiinid aga ka  $Zn^{2+}$  ammendumine (Egefjord jt., 2009; Smidt jt., 2009).

Katsed hiirtega on näidanud, et glükoosi tolerantsus ja insuliini sekretsioon on sõltuvuses ZnT8 valgu hulga insuliini sekretoorsete graanulite membraanis. Transporterite üleekspresioon suurendab ka  $Zn^{2+}$  sekretsiooni, samas langetab insuliini sekretsiooni ja parandab glükoosi taluvust. (Mitchell jt., 2016) ZnT8 on seotud beetarakkude elulemusega, kuna ZnT8 üleekspresioon beetarakkudes suurendab seal tsiingi sisaldust ja sellega kaitseb beetarakke apoptoosi eest (Chimienti jt., 2006).



**Joonis 4.** Insuliini sekretoorse graanuli membraanis paikneva ZnT8 valgu struktuur. Lisaks on näidatud ZnT8A humoraalse autoreaktiivsusega seotud peamine epitoop, mis on ah<sub>268</sub>-ah<sub>369</sub>, kus olulisem on 325 positsioonis R vahetus W-ga (R325W) (Kawasaki, 2012 artikli joonis, kuhu on lisatud Wenzlau jt., 2011 artikli andmed, muudetud).

Yi jt. väitsid, et ZnT8 autoantikehad on kõige informatiivsemad autoantikehad esimest tüüpi diabeedi ennustamiseks (Yi jt., 2015). Võrreldes teiste autoantikehadega, on teada, et ZnT8 on spetsiifilisemalt ekspresseeritud insuliini sisaldavates sekretoorsetes graanulites kui näiteks GAD65 ja IA-2 (Wenzlau jt., 2007). ZnT8A-d ilmnevad mitu aastat enne haiguse algust, kuid tavaliselt hiljem kui insuliini või GAD65 autoantikehad (Leslie jt., 2004). Vähem kui 10%-l ZnT8A positiivsetest patsientidest interakteeruvad autoantikehad valgu N-terminaalse domeeniga, aga peaaegu kõigil patsientidel, kellel on ZnT8A, esineb reageerimisvõime C-terminaalse domeeniga. Kõige olulisemaks peetakse C-terminaalses otsas olevat aminohappe positsiooni 325, kus võib olla kas arginiin, trüptofaan või glutamiin. (Wenzlau jt., 2008) Erinevus tekib geeni *SLC30A8* kahe üksiku nukleotiidi polümorfismi (SNP) rs13266634 (C/T) ja rs16889462 (A/G) tõttu, kus *SLC30A8* geen defineerib 325. positsiooni aminohappe ZnT8

valgus. Arginiin, trüptofaan ja glutamiin on kodeeritud vastava nukleotiidikombinatsiooniga CGG, TGG (rs13266634) ja CAG (rs16889462). (Wenzlau jt., 2009) Need kolm erinevat ZnT8 autoantikeha võivad ilmned üksi või erinevates kombinatsioonides. 53% autoantikehadest tunneb positsioonis 325 ära arginiini, 44% tuvastab trüptofaani ja 34% glutamiini. Nii R<sub>325</sub>, W<sub>325</sub> kui ka Q<sub>325</sub> äratundvaid autoantikehasid esineb umbes 30%. Esimest tüüpi diabeeti põdevatel inimestel on ZnT8RA kõige sagedasem ja ZnT8QA üksinda kõige haruldasem (Wenzlau jt., 2008). ZnT8WA-d ja ZnT8QA-d on rohkem leitud HLA-DQ8 haplotüübiga esmadiagnostitud T1D patsientidelt, samas kui DQ6.4 haplotüüpi seostatakse kõigi kolme ZnT8 autoantikehade variandiga (Andersson jt., 2013). Arvatakse, et pigem on ZnT8 epitoop konformatsiooniline kui lineaarne. Lisaks positsioonis 325 oleva aminohappe olulisusest epitoobis on kirjeldatud, et tähtsad on veel R<sub>332</sub>, E<sub>333</sub>, K<sub>336</sub> ja K<sub>340</sub>, mis aitavad kaasa suurema epitoobi tekkele ZnT8 C-terminaalses otsas (Wenzlau jt., 2011). Joonis 4 kirjeldab peamist ZnT8 epitoopi esimest tüüpi diabeedis. Homosügootset seisundit, mis tekib ZnT8 325. aminohappe positsioonis arginiini (CC genotüüp) või trüptofaani ehk (TT genotüüp) esinemisega, seostatakse esimest tüüpi diabeedi suurenenud riskiga lastel, kellel on ZnT8 karboksüterminusega seonduvad autoantikehad. CC või TT genotüüpi kandvatel lastel on alates sündimisest 59%-line tõenäosus haigestuda diabeeti viie aasta jooksul, samas kui heterosügootse CT genotüübiga (ZnT8Q) on tõenäosus 22% (Achenbach jt., 2009).

Äsja diagnoositud esimest tüüpi diabeedi patsientide ZnT8-ga seonduvad autoantikehad on seotud nii vanuse kui ka ainevahetusega (Niechciał jt., 2018). Mida nooremalt diabeet diagnoositakse, seda rohkem esineb ka ZnT8 vastaseid autoantikehasid. Jaapanis tehtud uuringus näidati, et kui T1D diagnoositakse <10 aastastel lastel, esineb ZnT8A-d 70% uuritavatest, mida on rohkem võrreldes teiste vanusegruppidega. Kui T1D diagnoositakse 10–14 aastasel on riskiskoor väiksem kui 18–30 aastastel, nimelt 50% ja 41%, ning >30 aastasel väheneb see veelgi ja on ligikaudu 24% (Kawasaki jt., 2011). Soomlaste poolt tehtud uuring näitas, et alaealistel T1D patsientidel on ZnT8A esinemissagedus 63%, samas aga täiskasvanutel, kellel diagnoositakse T1D esineb seda autoantikeha keskmiselt 18,7% (Andersen jt., 2013). Seega võib väita, et tsinktransporter 8 vastaste autoantikehade hulk sõltub lisaks vanusele ka etnilisest päritolust, seda seost kirjeldab tabel 2.

325. positsiooni SNP-idel on erinev mõju C-peptiidi kontsentratsioonile. ZnT8R autoantikehade kõrgemat tiitrit seostatakse toiduga stimuleeritud C-peptiidi suurenenud kontsentratsiooniga. *SLC30A8* geeni TT genotüübi kandjatel on 46% ja 60% madalam C-peptiidi kontsentratsioon mõõdetuna vastavalt 6 ja 12 kuud pärast T1D diagnoosimist võrreldes patsientidega, kellel on selle geeni CC ja CT genotüüp. (Andersen jt., 2012)

ZnT8 autoantikehad osalevad T1D tekkes ka läbi molekulaarse mimikri mehhanismi. Esimest tüüpi diabeeti põdevatel patsientidel ZnT8A tunneb ära *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis*-e epitoobi asümptomaatilise infektsiooni korral, kuna omab ZnT8-ga kahte sarnast järjestust. Need sarnasused näitavad, et ZnT8 võib olla sihtmärk valk, algatades bakteriaalse infektsiooni järgselt pankrease vastase autoimmuunsuse molekulaarse mimikri mehhanismi tagajärjel. (Masala jt., 2011; Masala jt., 2014)

## 1.6 Diagnostika esimest tüüpi diabeedi kindlakstegemiseks

Kuigi esimest tüüpi diabeedi progreseerumise hindamisel on autoantikehade erinevad mustrid informatiivsed, kasutatakse hetkel diagnoosimisel teistsuguseid lähenemisi. Diabeeti diagnoositakse plasmaglükooosi alusel: analüüsitakse kas kiiret plasmaglükooosi (FPG) või plasmaglükooosi taset pärast 2 tundi pärast 75 g glükooosi manustamist suu kaudu (2-h PG). (American Diabetes Association, 2017) Lisaks eelnevale diagnoositakse haigust ka vere glükohemoglobiini taseme alusel, mis on mõeldud eelkõige 2. tüüpi diabeedi diagnoosimiseks, kuid sellel on abistav roll ka esimest tüüpi diabeedi tuvastamises, kus diabeedi diagnostiliseks kriteeriumiks on glükohemoglobiin (HbA1c)  $\geq 48$  mmol/mol ( $\geq 6,5\%$ ). Seejärel tuleb diagnoos kinnitada korduva testimisega, selleks on sobilikud:

- a) korduvalt määratud vere glükohemoglobiini tase;
- b) seerumis/plasmas paastuglükooosi tase, mille puhul diabeedi diagnostiline kriteerium on  $\geq 7,0$  mmol/l;
- c) seerumis/plasmas juhusliku päevase glükooosi tase, mille diabeedi diagnostiline kriteerium on  $\geq 11,1$  mmol/l;
- d) glükooositaluvuse proov, mille diabeedi diagnostilised kriteeriumid on paastuglükooosi tase seerumis/plasmas  $\geq 7,0$  mmol/l ja/või glükooosi tase seerumis/plasmas 2 tundi pärast 75 g glükooosi manustamist  $\geq 11,1$  mmol/l.

Juhul kui glükohemoglobiini ja plasmaglükooosi testide kombineerimisel saadakse erinevad tulemid ehk ühe testi tulemus vastab diabeedile, aga teise tulemus mitte, on vajalik kinnitada diagnoos diabeeti näidanud analüüsi kordamisega. (Rajasalu, 2012)

Esimest ja teist tüüpi diabeeti on võimalik eristada C-peptiidi kontsentratsiooni erinevuse tõttu, mida saab mõõta nii verest kui uriinist (Jones ja Hattersley, 2013). C-peptiid moodustub koos insuliiniga proinsuliini jagunemisel, mis sünteesitakse Langerhansi saarekeste beetarakudes (Steiner jt., 1967). T1D haigust põdevatel inimestel on C-peptiidi kontsentratsioon alla referentsväärtuse, samas kui T2D haigetel üle normväärtuse (Jones ja Hattersley, 2013)

## 1.7 Diagnostilised testid

Haiguse diagnoosimisel on oluline seda kinnitada testiga. Diagnostiline test on meetod, mille eesmärgiks on haiguse olemasolu kinnitamine või ümberlükkamine, kus oluline on nii testi tundlikkus kui ka spetsiifilisus. (Peacock ja Peacock, 2011) Tundlikkus näitab, kui tõenäoliselt on haige inimese test positiivne ja spetsiifilisuse määraks loetakse kui tõenäoliselt on tervel inimesel test negatiivne. Test võib anda tulemusi, mis on valepositiivseid, kui terve inimene tunnistatakse haigeks, või valenegatiivseid, kui haige inimene tunnistatakse terveks. Ideaalse diagnostilise testiga on tegemist juhul, kui ei ole valenegatiivseid tulemusi, seega on sellise testi tundlikkus 100%, ega ka valepositiivseid tulemusi, sellisel juhul on spetsiifilisus 100%. Tundlikkust ja spetsiifilisust ühendab omavahel graafiline meetod nimega ROC-kõver, mis on vajalik kõikide testi piirväärtuste (CO) seast sobivaima CO leidmiseks. Graafiku absisstelljel on 1-spetsiifilisus ja ordinaatteljel tundlikkus. Kui testi tulemusel on valepositiivseid ja õigeid positiivseid väärtusi sama palju, on see kirjeldatav  $y=x$  graafikuga. (Campbell jt. 2007) Tundlikkuse ja 1-spetsiifilisuse jagamisel saadakse tõenäosuste suhe (LR), mis on tõenäosus, et kindlal patsiendil leitakse uuritav haigus jagatud tõenäosusega, et samal patsiendil, ei leita seda haigust. Kui saadud väärtused jäävad 0 ja 1 vahele, siis see vähendab haiguse tõenäosust. Ühest suurem tulemus suurendab haiguse esinemise tõenäosust. (McGee, 2002) ROC-kõvera all asuvat pindala (AUC) kasutatakse hindamaks kui hea on test, nii saab võrrelda konkreetset testi ideaalse testiga ja samuti omavahel kõrvutada kahte testi, mis on mõeldud sama analüüdi kindlaks tegemiseks. AUC 0,90 tähendab, et 90%-l juhtudest on haigete grupist mis tahes isiku valimisel selle indiviidi laboratoorse testi väärtus suurem kui ühel ükskõik millisel mitte seda haigust põdevate isikute grupist valitud indiviidil. (Campbell jt. 2007)

## 1.8 ZnT8 autoantikehade tuvastamismeetodid

ZnT8 puhul on tegemist transmembraanse valguga ja seetõttu on membraanikeskkonnast väljaspool keeruline säilitada valgu tertsiaarstruktuuri. Eelnevast tingituna on humoraalse ja rakkude poolt vahendatud autoreaktiivuse tuvastamine komplitseeritud. (Wenzlau jt., 2007) Kuigi ZnT8A detekteerivate testide välja töötamine on raskendatud, on teadlaste poolt arendatud mitmesuguseid erinevaid meetodeid selle autoantikeha määramiseks.

Detekteerimaks ZnT8 autoantikehasid optimeerisid Wenzlau ja tema koleegid radioimmuno testi. Nad kloneerisid inimese ZnT8 cDNA vektorisse ja viisid läbi *in vitro* transkriptsiooni ja translatsiooni, mille käigus antigeen märgistati  $^{35}\text{S}$ -metioniiniga. Saadud produkti inkubeeriti T1D seerumiga. Testi tundlikkus ja spetsiifilisus olid C-terminaalsel

peptiidi puhul, mis koosnes aminohapetest 268–369, vastavalt 50% ja 98% ja 1–369 aminohapelise peptiidi puhul tundlikkus 25% ja spetsiifilisus 98%. (Wenzlau jt., 2007)

Vaziri-Sani ja tema meeskond töötasid välja radiosidumise testi mõõtmaks seerumis ZnT8 autoantikehade kontsentratsiooni. Kõigepealt märgistati <sup>35</sup>S-metioniiniga ZnT8 valk ja teostati vedelfaasi anigeen-antikeha seondumine. Immuunkompleks detekteeriti Protein A Sepharose® graanulitel ja mõõdeti radioaktiivsus. Selle testiga suudeti tuvastada kõik kolm erinevat ZnT8 autoantikehade esinemise varianti. Testil on kõrge tundlikkus ja spetsiifilisus. Valepositiivseid tuvastati 1,9% ja valenegatiivseteks osutus 1,2% T1D patsiente. (Vaziri-Sani jt., 2011)

Yu ja tema meeskond töötasid välja kimäärse IA2-ZnT8WR molekuli, mis *in vitro* transleeriti ja seejärel kasutati radioimmuuntestis. Peptiid sisaldas IA-2 intratsellulaarse domeeni aminohappejääke 609–979, mis oli siduva järjestusega ühendatud ZnT8 C-terminaalse peptiididega, mis sisaldasid nii W kui R variante. (Yu jt., 2010)

RSR firma poolt välja töötatud ElisaRSR™ ZnT8 Ab™ test tuvastab autoantikehi, mis on R<sub>325</sub> või W<sub>325</sub> spetsiifilised või ah<sub>325</sub> mittespetsiifilised variandid. Testi spetsiifilisus on 97% ja tundlikkus 76%. (RSR Limited, 2016)

ZnT8 autoantikehade tuvastamiseks on kasutatud ka lutsiferaasi immunopretsipitatsiooni süsteemi (LIPS-i). LIPS on suure tundlikkuse ja spetsiifilisusega antikehade tuvastamise meetod, kus kasutatakse kas *Renilla* või *Gaussia* lutsiferaase. Seetõttu peetakse LIPS meetotit heaks alternatiiviks eelnevalt kirjeldatud radioaktiivsetele meetoditele. Antigeenina kasutati Ustinova ja tema kaastöötajate poolt arendatud testis modifitseeritud ZnT8 liitvalku. Modifitseeritud liitvalk koosnes kahest ZnT8 C-terminaalsest osast, millele oli liidetud *G. princeps* lutsiferaas (Gluc). Valgu järjestus on järgnev: sekretsiooni signaal – K<sub>268</sub> – ... – W<sub>325</sub> – ... D<sub>369</sub> ~ K<sub>268</sub> – ... – R<sub>325</sub> – ... – D<sub>369</sub> – Gluc. Täiskasvanute seerumitel saadi kõveraalse pindala (AUC) tulemuseks 0,789 (95% CI 0,677 kuni 0,877) ning laste puhul AUC tulemuseks 0,754 (95% CI 0,628 to 0,854). See test tuvastab IgG klassi autoantikehasid, samas kui RSR ZnT8 ELISA tuvastab lisaks IgG-le ka IgM-i ja IgA-d. Autorid oletasid, et LIPS-i väike efektiivsus, eriti laste puhul võib olla tingitud tõenäoliselt noorte uuritavate seerumites esinevatest IgM klassi ZnT8 vastastest autoantikehadest. (Ustinova jt., 2014)

Hiljuti töötati välja elektrokemoluminestsents meetod mõõtmaks ZnT8, lisaks sellele valgule mõõtedakse testis ka kolme peamist autoantikeha, milleks on IAA, GAD65A, IA-2A. Elektrokemoluminestsentsi meetod kujutab endast streptavidiiniga kaetud pinnale biotiiniga ja sulfo-TAG™-iga märgistatud antigeeni kandmist ning nende detekteerimist seerumis olevate antikehadega. See meetod on hetkel tundlikum kui kuldstandardiks loetud radiosidumise test. Tundlikkuse suurenemine võib olla tingitud asjaolust, et see elektrokemoluminestsents meetod püüab kinni IgG, IgM, IgA. Samuti on eeliseks radioimmuuntesti ees selle suurem

läbilaskevõime, väiksema seerumikoguse vajadus, madalam hind ning mitteradioaktiivmärgiste kasutamine. (Gu jt., 2017)

## **1.9 Ensüümvahendatud immuunsorptsioonmeetod**

Ensüümvahendatud immuunsorptsioonmeetod (ELISA) töötati välja 1971 aastal kahe eraldiseisva uurimisrühma teadlaste poolt samaaegselt (Engvall ja Perlmann, 1971; Van Weemen ja Schuurs, 1971). ELISA-t peetakse mitmekülgeks, täpseks, korratavaks, kvantitatiivseks ja kvalitatiivseks meetodiks bioloogilistes proovides antigeenide või antikehade määramisel. See meetod leiab rakendust nii diagnostikas, näiteks haiguste markerite ja allergeenide tuvastamises, kui ka bioloogilise uurimistööde arendustes. (Anaya jt., 2013) ELISA põhineb immunoloogia põhikontseptsioonil, milleks on antikeha ja antigeeni spetsiifiline seondumine. Antigeeniks võivad olla näiteks valgud, peptiidid, hormoonid (Gan ja Patel, 2013).

Tundub, et eesti keeles puudub üksmeel ELISA akronüümi väljakirjutamisel, seetõttu on leitav palju erinevaid vasteid. Ensüümvahendatud immuunsorptsioonmeetodi nimi viitab aga, et oluliseimal kohal on tahkele kandjale seotud antikeha või antigeen ning ensüümiga märgistatud sekundaarne antikeha, mis on oluline interaktsiooni hindamiseks. Juhul kui ELISA analüüsis on tegemist antikeha määramisega, toimub antigeeni seotumine tahkele kandjale (Aydin, 2015). Seondumine võib olla passiivse adsorptsiooni vahendusel, sellisel juhul on tegemist otsese katmisega, või esmalt antigeeni spetsiifilise antikeha adsorbeerimisega tahkele kandjale, sellisel juhul on tegemist kaudse katmisega. Antigeeni immobiliseerimise hulgast sõltub ELISA tundlikkus. Mida rohkem antigeeni on pinnale seondunud, seda tundlikum on test. (Thermo Scientific, 2010) Tahke kandjana võib kasutada näiteks mikroplaate, mis võivad olla tehtud polüstüreenist, polüvinüülist või polüpropüleenist (Aydin, 2015). Kõige rohkem kasutatakse polüstüreenist plaate (Thermo Scientific, 2010). Sihtmärk-antigeen peaks olema lahuses, mis lubab sellel interakteeruda, kas otse või eelkaetud plaadiga. Valguliste antigeenide puhul on tegu paindlike molekulidega, mistõttu võib nende kolmedimensionaalne struktuur adsorptsiooni protsessil muutuda ja viia epitoopide kaole keskkonnas, mis ei ole vedelik. Ennetamaks eelnevat probleemi on soovitatav plaat katta enne siduva valguga. (Thermo Scientific, 2010)

Ensüümkonjugaadi kontsentratsioon on ELISA-s samuti oluline. Ensüümkonjugaadi liiga väikse hulga korral on signaal väga nõrk koos halva signaali ja müra suhtega. Kui ensüümkonjugaati on palju, on taustasignaal kõrge ja seetõttu esineb kehva signaali ja müra suhe. (Thermo Scientific, 2010) Ensüümid, mis leiavad ELISA-s rakendust, on näiteks peroksüdaas,

aluseline fosfataas, beetagalaktosidaas. Ensüümihulga visualiseerimiseks kasutatakse vastavaid kromogeenseid substraate, mille järgi saab määrata tekkinud värvuse intensiivsust kindlal lainepikkusel. (Aydin, 2015; Porstmann ja Kiessing, 1992) Tuntuimad ensüümid ja nende kromogeensed substraadid on leitud tabelis 1.

Tekkinud värvuse intensiivsust on võimalik määrata kahel viisil, kas silmaga või spektrofotomeetrit kasutades. Silmaga määramise puhul on tegemist kvalitatiivse ja spektrofotomeetriga määramise puhul kvantitatiivse analüüdi tuvastamise meetotiga. (Anaya jt., 2013) Lisaks võimaldavad ELISA variandid hinnata fluorestsentsi, kemoluminestsentsi või kemofluorestsentsi, need aga vajavad teistsuguseid substraate (Thermo Scientific, 2010).

**Tabel 1.** ELISA-s kasutatavad ensüümid ning nende substraadid (Porstmann ja Kiessing 1992, muudetud).

Ensüüm	Allikas	Kromogeene substraat ja mõõtmise lainepikkusel
<b>peroksüdaas</b>	mädarõigas	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> / 2,2'-asino-di-(3-etüülbensotiasoliinsulfoonhape-6); λ= 415 nm
		H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> / 3,3', 5'5'-tetrametüülbensidiin; λ= 450 nm
		H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> / o-fenüleendiamiin; λ= 492 nm
<b>aluseline fosfataas</b>	vasika sool	p-nitrofenüül-fosfaat; λ= 405 nm
<b>β-galaktosidaas</b>	<i>E. coli</i>	o-nitrofenüül-β-D-galaktopüranosiid; λ= 420 nm

ELISA jaotatakse homogeenseks ja heterogeenseks ensüümaatiliseks immuuntestiks. Homogeensetes ensümaatilistes meetodites muutuvad ensüümid inaktiivseteks kui nad on seotud antikehaga ja seetõttu ei ole vaja pesemist. Nende eelis heterogeense meetodidiga võrreldes on lihtsus. Heterogeenseid ensümaatilisi meetodeid kasutatakse rohkem, kuna need on tundlikumad kui homogeensed. Erinevalt homogeensetest vajavad heterogeensed meetodid pesemise faasi seostumata antigeeni või antikeha eemaldamiseks. (Aydin, 2015) Lisaks homogeensetele ja heterogeensetele ELISA meetoditele toimub nende jaotamine järgnevalt: otsene, kaudne, konkureeriv ja kihiline (joonis 5).

Otsene (*direct*) – Esmaselt loodud ELISA. Kõigepealt kaetakse tahke kandja pind otse antigeeniga. Seejärel toimub ensüümiga märgistatud antikeha lisamine ning ensüümilahuse lisamine. Ensüümi ja substraadi interaktsioonil toimub värvuse muutus mida on võimalik detekteerida. (Aydin, 2015).

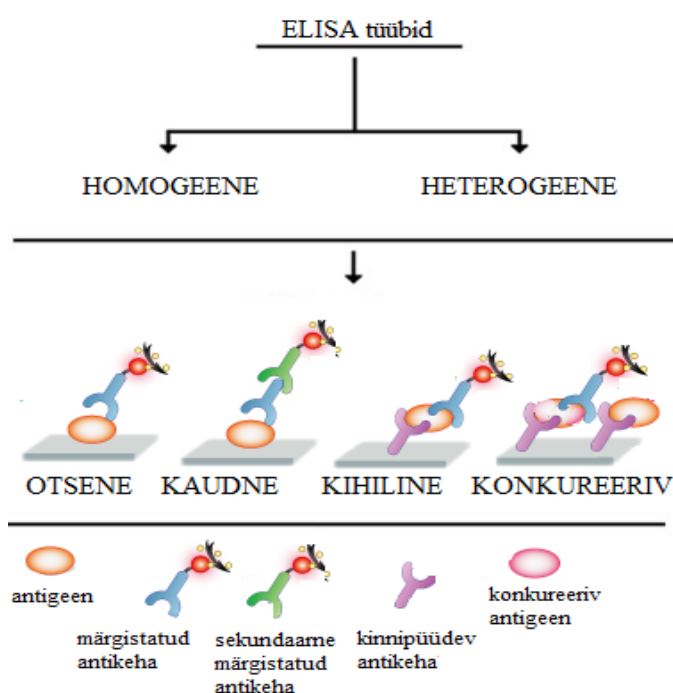
Kaudne (*indirect*) – Otsese ELISA edasiarendus, mis töötati välja 1978 a. Lindströmi ja Wageri poolt. Oluline erinevus otsesest ELISA-st on see, et primaarse antikehaga



interakteeruv sekundaarne antikeha määrab mõõdetava antigeeni. (Lindström ja Wager, 1978; Aydin, 2015)

Konkureeriv (*competitive*) – 1976. aastal Yorde ja tema kaastöötajate poolt välja töötatud ELISA edasiarendus. Pinnad kaetakse esmalt antikeha spetsiifilise antigeeniga. Seejärel lisatakse analüüsimaatriksisse märgistatud ja märgistamata antigeenid, neist viimane on analüüt. Need kaks erinevat antigeenigruppi konkureerivad omavahel, kuna tahkel kandjal on limiteeritud arv seondumiskohti. Pärast ensüümsubstraadilahuse lisamist on võimalik kvantifitseerida märgistatud antigeeni kontsentratsioon. Kalibratsioonigraafik selle meetodiga erineb teistest, kuna seos analüüdi ja signaalitugevuse vahel on pöördvõrdeline. (Yorde jt., 1976; Aydin, 2015)

Kihiline (*sandwich*) – 1977. aastal Kato ja tema kaastöötajate poolt väljatöötatud meetod. Meetodi nimi tuleb asjaolust, et relevantne antigeen on kahe erinevat tüüpi antikeha vahel. Esmalt toimub tahke kandja katmine antikehaga ning alles siis uuritava prooviga inkubatsioon ning seejärel märgistatud sekundaarse antikeha lisamine. Värvuse intensiivsem tulem näitab positiivset tulemust, seega näitab kalibratsioonigraafik võrdelisest seost signaalitugevuse ja analüüdi kontsentratsiooni vahel. (Kato jt., 1977; Aydin, 2015)



**Joonis 5.** ELISA erinevad tüübid (Aydin 2015, muudetud kasutades Creative Diagnostics visuaali).

Kõige laialdasemalt kasutatakse ELISA tahke kandjana 96-kannulist polüstüreen mikroplaati. Kõik mikroplaadiga ELISA variandid sõltuvad samadest elementidest:

1. katmine – otsene või kaudne antigeeni immobilisatsioon polüstüreen mikroplaadi kaevukestes;
2. plaadi blokeerimine – valgu või mõne muu molekuli lisamine, mis on vajalik mitte-spetsiifilise interaktsiooni vähendamiseks;
3. märgistamine – inkubatsioon antigeeni spetsiifilise antikehaga, mis seondub antigeeniga;
4. signaali mõõtmine – signaali detekteerimine, mis on tekkinud kas otse või sekundaarse märgise kaudu antikehal. (Thermo Scientific, 2010)

### 1.10 ZnT8 autoantikehade seos teiste diabeedivormidega

Üha enam selgub, et piirid erinevate diabeedivormide vahel muutuvad hägusemaks ja diabeedispekter on pigem pidev, minnes ühest vormist teise. Yi ja tema kaastöötad püstitasid hüpoteesi, et ZnT8 võib diabeedi spektris oluliseimat rolli mängida. Sõltuvalt keskkonna ja elustiili teguritest on *SLC30A8* genotüübil kas diabeedi eest kaitsev või seda soodustav võime. (Yi jt., 2016)

*SLC30A8* geenil on erinev roll esimest ja teist tüüpi diabeedi puhul. Ülegenoomsed uuringud on näidanud, et *SLC30A8* geeni mittesünonüümne SNP (rs13266634 C>T), mille tulemusel on 325 positsioonis olev arginiin muutunud trüptofaaniks, on seotud teist tüüpi diabeediga (Sladek jt., 2007). C alleeli rs13266634 SNP vähendab ZnT8 valgu ekspressiooni ja transpordi aktiivsust põhjustades vähenenud tsingi kontsentratsiooni, mis hiljem halvendab beetarakkude funktsiooni. Samas on huvitav, et paljudel isikudel esineb diagnoosi järgi, kas T1D või T2D, kuigi nad kannavad kõik sama *SLC30A8* rs13266634 genotüüpi. (Yi jt., 2016)

Teatud mutatsioonid võivad vähendada diabeeti riski. *SLC30A8* geeni 12 haruldasel *loss-of-function* mutatsioonil on teist tüüpi diabeedi eest kaitsev efekt. Kui need mutatsioonid on domineerivamad diabeeti soodustavatest keskkonnafaktoritest, on indiviididel 65% väiksem haigestumise risk. (Flannick jt., 2014)

Genotüübile lisaks on oluline roll ka keskkonnafaktoritel, mis osalevad diabeedi tüübi määramisel. Üldiselt on teada, et teist tüüpi diabeedi tekkel mängivad rolli vanus, rasvarikka toidu tarbimine ja ülekaal. Hiirtega tehtud katsed näitavad, et ZnT8 funktsioon on sõltuv vanusest, soost ja toitumisharjumustest. (Lemaire jt., 2009; Nicolson jt., 2009; Pound jt., 2012) ZnT8-nokautidel (ZnT8<sup>-/-</sup>) (*knockout*), keda toideti tavapärase dieediga, ei nähtud muutusi glükoosi tolerantsuses ega ka insuliini tundlikkuses, samas kui pärast rasvarikast dieeti

muutused osad hiired ülekaalulisteks. Neil tekkis glükoosi talumatus ja nende beetarakkude saared muutusid vähem reageerivamaks glükoosile. Pooltel hiirtel ilmnis pärast rasvarikast dieeti teist tüüpi diabeet. (Lemaire jt., 2009; Nicolson jt., 2009)

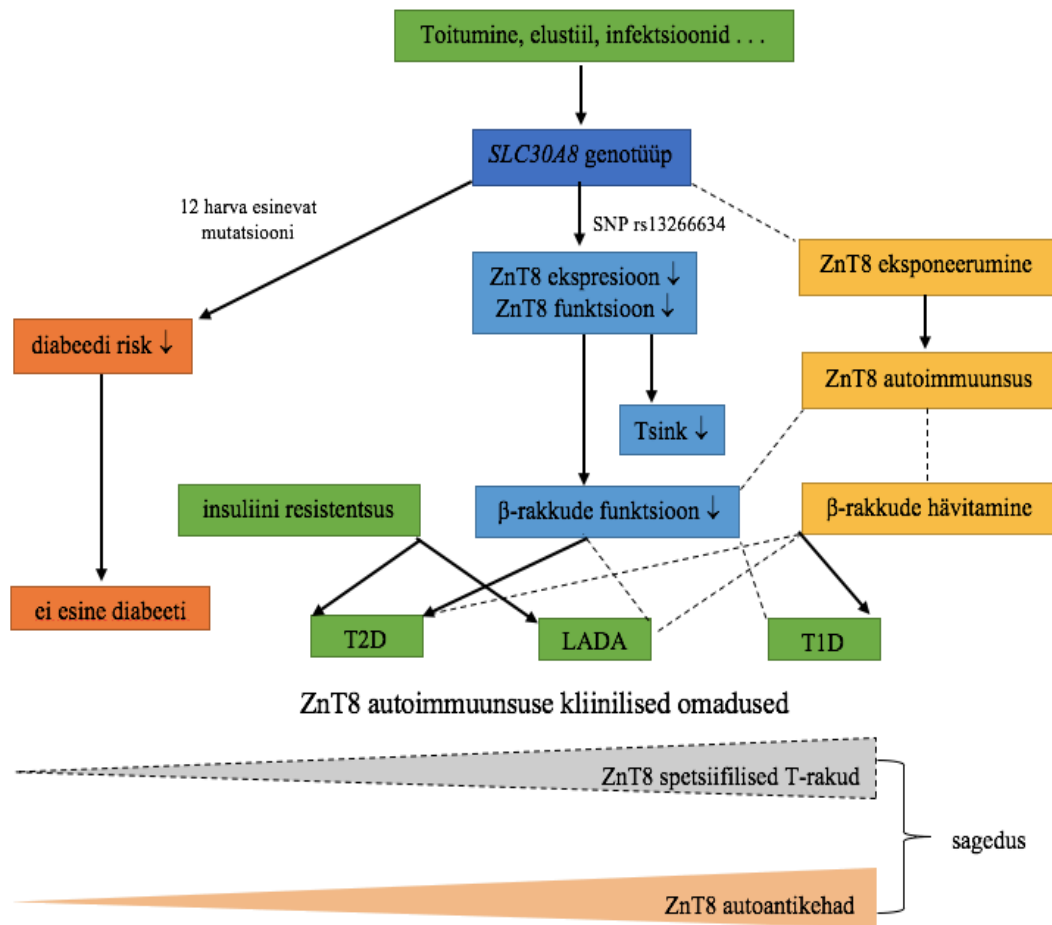
Esimest ja teist tüüpi diabeedis on beetarakkudes asuva ZnT8 roll erinev. Beetarakkude halvenenud funktsioon võib olla tingitud ZnT8 osalemisest insuliini biosünteesis ja vabanemises, mis seejärel võib põhjustada T1D või T2D. Hiirega tehtud katsed näitavad, et T2D varajastes staadiumites on ZnT8 valgu ekspressioon märkimiväärselt langenud, seda on seostatud halvenenud beetarakkude funktsiooniga (Tamaki jt., 2009). ZnT8 alanemine põhjustab pankrease saarekestes tsiingi kontsentratsiooni vähenemise. Insuliini biosünteesi reguleerib otseselt ZnT8, mis osaleb glükoosi poolt stimuleeritud insuliini sekretsioonis ja biosünteesis. Insuliini biosünteesi ja sekretsiooni käigus võib insuliinigraanulite eksotsütoos suurendada ZnT8 ekspresseerumist raku pinnale. (Davidson jt., 2014) Eelnev põhjustab ZnT8 epitoobi spetsiifiliste T-rakkude vahendatud beetarakkude hävimise ning viib esimest tüüpi diabeedi, teist tüüpi diabeedi või latentse autoimmuunse täiskasvanute diabeedini. (Yi jt., 2016) Esimest tüüpi diabeedis on ZnT8 peamine CD8<sup>+</sup> T-rakkude poolt tuvastatav sihtmärk (Énéem jt., 2012). ZnT8-spetsiifiliste T-rakkude hulk väheneb sujuvalt alates T1D-st kuni tervete kontrollideni. (Yi jt., 2016) Eelnevat näitab illustratiivne skeem (joonis 6), mis kirjeldab *SLC30A8* genotüübi rolli erinevate diabeedi tüüpide avaldumisel.

ZnT8 autoantikehade hulk sõltub lisaks diabeedi tüübist ka etnilisest päritolust. Soomes läbiviidud uuring näitas, et LADA diagnoositud isikutel esineb ZnT8A ~1,8 korda rohem kui äsjadiagnoositud T1D patsientidel (Andersen jt., 2013). Rohkem seoseid etnilise päritolu ja diabeetitüüpide kohta kirjeldab tabel 2.

**Tabel 2.** ZnT8A esinemisprotsent vastavalt etnilisele päritolule ja diabeedi vormile. (Yi jt., 2015, muudetud)

Etniline pärtolu	Äsja diagnoositud lapsega T1D (%)	Äsja diagnoositud täiskasvanuea T1D (%)	Latentne täiskasvanuea autoimmuunne diabeet* (%)	Teist tüüpi diabeet <sup>†</sup> (%)	Esimese põlvkonna sugulased (%)
USA	60,00–80,00 ⊗	60,00–80,00 ⊗	-	<3,00	0,90
Jaapan	58,00	34,00	-	-	-
Hiina	24,10 ⊗	-	10,70	0,40	-
Soome	63,00	18,70	34,30	-	-
Norra	8,70	22,00	6,20	-	-
Rootsi	80,00	66,00	42,00	-	-
Argentiina	-	-	23,50	8,90	-
Belgia	58,00 ⊗	58,00 ⊗	-	-	1,46
Tähised: *T2D koos GADA65+, <sup>†</sup> T2D koos GADA65-, ⊗T1D sõltumata vanusest					

### Võimalik ZnT8 rada erinevate diabeedi tüüpide kujunemisel



**Joonis 6.** SLC30A8 genotüübi erinev mõju diabeedi tekkele sõltuvalt keskkonna ja elustiili teguritest. Ühtlased jooned tähistavad kindlat efekti, katkendlikud jooned tähistavad võimalikku efekti. (Yi jt., 2016, muudetud)

## 2. EKSPERIMENTAALNE OSA

### 2.1 Töö eesmärgid

Magistritöö eesmärgiks oli kasutades ELISA-t hinnata, kui hästi kirjeldab lühike 18 aminohappe pikkune ja peamisele epitoobile vastav peptiid (A771) ZnT8 vastaste IgG isotüüpi autoantikehade esinemist esimest tüüpi diabeeti haigestunud isikutel võrreldes enamikes testides kasutatava pikema peptiidiga (2C-ga). Saadud tulemusi võrreldi kliinilises praktikas kasutatava ElisaRSR™ ZnT8 Ab™ testi ning LIPS testi tulemustega, kus mõlemas kasutatakse 2C peptiidi. Töö hõlmab endas:

- ❖ ELISA tingimuste optimeerimist;
- ❖ ELISA teostamist antigeenidega A771 ja 2C;
- ❖ tulemuste statistilist analüüsi;
- ❖ erinevate ZnT8A testide võrdlust.

## 2.2 Materjalid ja meetodid

### 2.2.1 Uuringumaterjal ja valimi kirjeldus

Uuringus kasutatud seerumid olid pärit Tartu Ülikooli bio- ja siirdemeditiini instituudi immunoloogia osakonna biopangast, mis on loodud kooskõlas Tartu Ülikooli inimuuringute eetika komitee loa protokollidega 63/T-6 (2007) ja 275/M-13 (2017). Uuritavad proovid jagati vastavalt diagnoosile kaheks grupiks: T1D põdevad patsiendid ja mittepõdevad kontrollid. Vastavalt vanusele toimus kahe grupi jaotamine alagruppideks: alaealised (1–17 aastased) ning täiskasvanud (18–79 aastased). Alaealiste grupis oli diagnoosi järgi 50 kontrolli (m=29, n=21) ja 65 T1D patsienti (m=29, n=36). Täiskasvanute grupis oli 48 kontrolli (m=17; n=31) ja 32 T1D (m=17, n=15) patsienti. Valimit kirjeldab tabel 3.

**Tabel 3.** Valimi kirjeldus. "T1D" tähistab esimest tüüpi diabeedi diagnoosiga ja "Kontroll" kontrollgruppi kuuluvaid uuritavaid.

Uuritavad		Antigeen Diagnoos	A771 peptiid		2C peptiid	
			Kontroll	T1D	Kontroll	T1D
alaealised (1–17 a.)	naised [(isikud) noorim keskmine  vanim]		(21) 5,4 10,7  17,6	(33) 3,1 9,8  16,2	(17) 5,8 9,8  17,6	(34) 3,1 9,6  15,2
	mehed [(isikud) noorim keskmine  vanim]		(26) 1,4 7,3  16,1	(25) 2 8,2  16,1	(27) 1,4 6,8  16,1	(27) 2 8,9  16,1
täiskasvanud (18–79 a.)	naised [(isikud) noorim keskmine  vanim]		(31) 19,3 30,5  68,2	(15) 22,5 39,9  68,2	(31) 19,3 30,5  68,2	(15) 22,5 39,9  68,2
	mehed [(isikud) noorim keskmine  vanim]		(17) 20,4 33,5  78,5	(17) 18,3 29,1  40,7	(16) 20,4 33,6  78,5	(17) 18,3 29,1  40,7

### 2.2.2 Kasutatud reagensid ja aparatuur

Plaadid:

1. Maxisorp (Nunc-Immuno).

Aparatuur:

1. horisontaalloksuti mudel YellowLine OS5 basic (IKA),
2. spektrofotomeetri mudel Multiskan MCC/340 (Labsystems),
3. veepuhastussüsteemi mudel Milli-Q Synthesis A10 (Millipore).

Peptiidid:

1. 2C (RSR),
2. A771 (Storkbio),
3. A961 (Storkbio).

Reagendid:

1. 3,3', 5,5'-tetrametüülbensidiin (Sigma),
2. avidiin (ChemCruz),
3. dimetüülsulfoksiid (AppliChem),
4. etanoolamiin (Fluka),
5. glütsiin (Fluka),
6. lõssipulber (Sigma),
7. määratõika peroksüdaasiga (HRP-ga) märgistatud küüliku polükloonne inimese IgG vastane antikeha (Dako),
8. polüvinüülpürrolidoon (Merck),
9. veise seerumi albumiin (BSA) (Alfa Aesar),
10. želatiini hüdroolüsaat (Sigma),
11. Tween20 (Euroimmun),
12.  $C_2H_3OONa$  (Fluka),
13.  $CH_3OH$  (Sigma-Aldrich),
14.  $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$  (BGD Laboratory Supplies),
15. EDTA- $Na_2$  (AppliChem),
16.  $H_2SO_4$  (Sigma-Aldrich),
17.  $H_2O_2$  (AppliChem),
18. KCl (AppliChem),
19.  $K_2HPO_4$  (Sigma),
20. NaCl (Sigma),
21.  $Na_2CO_3$  (Scharlau Chemie),
22.  $Na_2HPO_4 \cdot H_2O$  (Sigma).

Antigeenina kasutati kahte erinevat peptiidi, mille järjestus vastas ZnT8 C-terminaalsele järjestusele ja oli märgistatud biotiiniga. Lühema peptiidi A771 järjestus: biotiin – S<sub>324</sub> – R<sub>325</sub> – D<sub>326</sub> – S<sub>327</sub> – Q<sub>328</sub> – V<sub>329</sub> – V<sub>330</sub> – R<sub>331</sub> – R<sub>332</sub> – E<sub>333</sub> – I<sub>334</sub> – A<sub>335</sub> – K<sub>336</sub> – A<sub>337</sub> – L<sub>338</sub> – S<sub>339</sub> – K<sub>340</sub> – S<sub>341</sub> ning pikema peptiidi 2C järjestus: biotiin – valkX – K<sub>268</sub> – ... – W<sub>325</sub> – ... D<sub>369</sub> ~ K<sub>268</sub> – ... – R<sub>325</sub> – ... D<sub>369</sub>, seda peptiidi kasutakse ka RSR firma poolt müüdavas ElisaRSR™ ZnT8 Ab™ testis. Autoantikehade inhibitsiooni katses kasutati A961 peptiidi, millel on sama järjestus, mis A771-l, aga ilma biotiinita.

## **2.2.3 Ensüümvahendatud immuunsorptsioonmeetodi optimeerimine**

### **2.2.3.1 Plaadi otsene katmine peptiidiga**

Kasutati 96-kannulist Maxisorp plaati, kus nii igat analüüsitavat seerumit, kontrollseerumit kui ka sekundaarset antikeha oli kaks paralleeli. Kontrollseerum valiti LIPS analüüsist saadud kõrge ZnT8A IgG väärtuse järgi.

96-kannuga Maxisorp plaat kaeti A961 peptiidilahusega. Katsed teostati kahe erineva peptiidikontsentratsiooniga, mis olid 0,75 µg/ml ja 0,075 µg/ml PBS-puhverlahuses (vt. LISA 1). Igasse kannu kanti 100 µl peptiidilahust ning inkubeeriti 4 °C juures 1 h. Seejärel pesti 200 µl/kann PBS-Tween 20-puhverlahusega (PBS-T-ga) (vt. LISA 1). Pärast mida blokeeriti 200 µl/kann 3%-lise BSA-lahusega (vt. LISA 1) 1 h ja pesti 3 min 200 µl/kann PBS-T-ga (vt. LISA 1). Uuritavad seerumid lahjendati PBS-puhverlahusega (vt. LISA 1) 1:100 või 1:500 ning kanti 100 µl/kann, inkubeeriti 1 h toatemperatuuril horisontaaloksutil 320 p/min. Seejärel pesti plaati 3 x 3 min 200 µl/kann PBS-T-ga (vt. LISA 1). Pärast mida kaeti 100 µl/kann HRP-ga märgistatud küüliku polükloonse inimese IgG vastase antikeha 5000 kordse lahjendusega PBS-T-s (vt. LISA 1) ja inkubeeriti 1 h toatemperatuuril horisontaaloksutil 320 p/min. Seejärel pesti 4 x 3 min 200 µl/kann PBS-T-ga (vt. LISA 1) ja kaeti 100 µl/kann ilmutamislahusega (vt. LISA 1) ning inkubeeriti 10 min pimedas toatemperatuuril. Reaktsioon peatati 10 või 20 min pärast 50 µl/kann 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-ga. Tekkinud värvuse intensiivust mõõdeti spektrofotomeetriga lainepikkusel 450 nm.

### **2.2.3.2 Peptiidi immobiliseerimine avidiini vahendusel**

96-kannuline Maxisorp plaat kaeti 100 µl/kann avidiinilahusega (vt. LISA 1) kontsentratsiooniga 5 µg/ml, suleti õhukindlalt ning inkubeeriti 4 °C juures 20 h. Seejärel pesti plaati 3 min 200 µl/kann PBS-T-ga (vt. LISA 1) ning blokeeriti blokeerimislahusega 200 µl/kann 3%-lise BSA-lahusega (vt. LISA 1) 1 h toatemperatuuril 320 p/min. Pesti 200 µl/kann PBS-T-ga (vt. LISA 1) ja inkubeeriti 1 h 100 µl/kann A771 peptiidilahusega, mille kontsentratsioon oli 0,75 µg/ml PBS-is (vt. LISA 1) toatemperatuuril horisontaaloksutil 320 p/min. Seejärel pesti 3 x 3 min 200 µl/kann PBS-T-ga (vt. LISA 1) ja inkubeeriti seerumilahjendustega 1:100 PBS-is (vt. LISA 1) horisontaaloksutil 2 h toatemperatuuril 320 p/min. Sellele järgnes pesemine 3 x 3 min 200 µl/kann PBS-T-ga (vt. LISA 1) ning inkubeerimine 100 µl/kann HRP-ga märgistatud küüliku polükloonse inimese IgG vastase



antikeha 5000 kordse lahjendusega PBS-s (vt. LISA 1) 1 h toatemperatuuril horisontaaloksutil 320 p/min. Seejärel pesti plaati 4 x 3 min 200 µl/kann PBS-T-ga (vt. LISA 1) ning kaeti 100 µl/kann ilmutamislahusega (vt. LISA 1) ja inkubeeriti 10 min pimedas toatemperatuuril. Reaktsioon peatati 50 µl/kann 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-ga. Tekkinud värvuse intensiivust mõõdeti spektrofotomeetriga lainepikkusel 450 nm.

### **2.2.3.3 Mittespetsiifilise seondumise vähendamine**

*Soola lisamine puhverlahusele* – ELISA teostati PBS-T puhverlahusele NaCl lisamisega lõppkontsentratsioonini 0,35 M.

*Avidiini mõju antikehade mittespetsiifilisele seondumisele* – Avidiini mõju uurimisel mittespetsiifilisele seondumisele valmistati avidiinilahus kontsentratsiooniga 250 µg/ml PBS-Tween 20-NaCl (0,35 M) puhverlahusesse (PBS-T-NaCl) (vt. LISA 1). Seda puhverlahust kasutati seerumilahjenduste 1:500 valmistamisel.

*Sobiva blokeerimislahuse leidmine* – ELISA teostati lisaks eelnevalt mainitud nii 3%-lise BSA-lahusega (vt. LISA 1), 1%-lise lõssipulbrilahusega (vt. LISA 1) kui ka SAT1 (vt. LISA 1) ja SAT2-ga (vt. LISA 1). Inkubatsioon teostati 1%-lise lõssipulbrilahusega 1 h ja SAT1 ning SAT2-ga 15 min horisontaaloksutil 320 p/min. SAT1 võeti edasistesse katsetustesse.

### **2.2.3.4 Kontsentratsiooni ja ilmutamisaja optimeerimine**

96-kannuline plaat kaeti 100 µl/kann avidiinilahusega (vt. LISA 1), suleti õhukindlalt ja inkubeeriti 4 °C juures 20 h. Seejärel pesti 3 min 200 µl/kann PBS-T-NaCl (vt. LISA 1). Katsetati kahe erineva A771 peptiidi kontsentratsiooniga, mis olid 0,75 µg/ml või 0,075 µg/ml PBS-s (100 µl/kann) ja inkubeeriti horisontaaloksutil 1 h. Pesti 3 min 200 µl/kann PBS-T-NaCl-ga (vt. LISA 1). Blokeeriti 200 µl/kann SAT1-ga (vt. LISA 1) ja inkubeeriti 15 min horisontaaloksutil 320 p/min. Pesti 3 min 200 µl/kann PBS-T-NaCl-ga (vt. LISA 1). Kaeti 100 µl/kann 1:100 või 1:500 seerumilahjendustega PBS-T-NaCl-s (vt. LISA 1) ja inkubeeriti 2 h horisontaaloksutil 320 p/min. Seejärel pesti 3 x 3 min 200 µl/kann PBS-T-NaCl-ga (vt. LISA 1). Plaat kaeti 100 µl/kann HRP-ga märgistatud küüliku polükloonse inimese IgG vastase antikeha 5000 kordse lahjendusega PBS-T-NaCl-is (vt. LISA 1) ja inkubeeriti 1 h horisontaaloksutil 320 p/min. Pesti 4 x 3 min 200 µl/kann PBS-T-NaCl-ga (vt. LISA 1). Selle järel kaeti plaat 100 µl/kann ilmutamislahusega (vt. LISA 1) ja inkubeeriti 10 min või 20 min

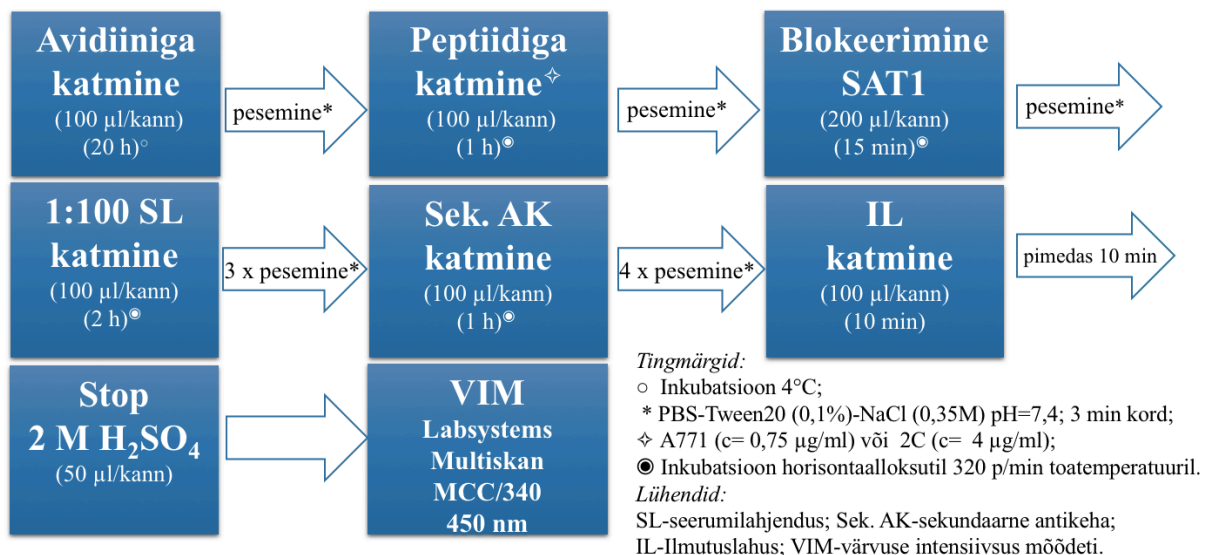
pimedas toatemperatuuril. Reaktsioon peatati 50 µl/kann 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-ga. Tekkinud värvuse intensiivust mõõdeti spektrofotomeetriga lainepikkusel 450 nm.

#### **2.2.4 Optimeeritud ensüümvahendatud immuunsorptsioonmeetod**

Kasutati 96-kannulist Maxisorp plaati, kus nii igat analüüsitavat seerumit, kontrollseerumit kui ka sekundaarset märgistatud antikeha oli kaks paralleeli. Kontrollseerum valiti LIPS analüüsist saadud ZnT8A IgG kõrge väärtuse järgi.

Plaat kaeti 100 µl/kann avidiinilahusega (vt. LISA 1), suleti õhukindlalt ja inkubeeriti 4 °C juures 20 h. Seejärel pesti 3 min 200 µl/kann PBS-T-NaCl (vt. LISA 1). Järgmisena kaeti peptiidiga 100 µl/kann (A771 peptiid (c=0,75 µg/ml PBS-s (vt. LISA 1) või 2C peptiid (c=4 µg/ml PBS-s (vt. LISA 1)) ja inkubeeriti 1 h horisontaaloksutil 320 p/min. Pärast seda pesti 3 min 200 µl/kann PBS-T-NaCl-ga (vt. LISA 1) ja blokeeriti 200 µl/kann SAT1-ga (vt. LISA 1) ning inkubeeriti 15 min horisontaaloksutil 320 p/min. Selle järel pesti 3 min 200 µl/kann PBS-T-NaCl-ga (vt. LISA 1) ja kaeti 100 µl/kann seerumilahendustega 1:100 PBS-T-NaCl-s ning inkubeeriti 2 h horisontaaloksutil 320 p/min. Pärast seda pesti 3 x 3 min 200 µl/kann PBS-T-NaCl-ga (vt. LISA 1). Seejärel kaeti plaat 100 µl/kann HRP-ga märgistatud küüliku polükloonse inimese IgG vastase antikeha 5000 kordse lahjendusega PBS-T-NaCl-s (v.t LISA 1) ja inkubeeriti 1 h horisontaaloksutil 320 p/min. Pärast seda pesti 4 x 3 min 200 µl/kann PBS-T-NaCl-ga (vt. LISA 1) ja kaeti ilmutamislahusega (vt. LISA 1) 100 µl/kann ning inkubeeriti 10 min pimedas. Reaktsioon peatati 50 µl/kann 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Tekkinud värvuse intensiivust mõõdeti spektrofotomeetriga lainepikkusel 450 nm.

Joonis 7 kujutab optimeeritud ensüümvahendatud immuunsorptsioonmeetodi blokk skeemi, mida rakendati uuritavate seerumite analüüsis, kasutades biotiiniga märgistatud antigeenne A771 või 2C.



**Joonis 7.** Optimeeritud ensüümvahendatud immuunsorptsioonmeetod, mida kasutati seerumites olevate ZnT8 vastaste autoantikehade tuvastamisel antigeenide A771 ja 2C spetsiifiliselt.

## 2.2.5 Autoantikehade seondumise inhibeerimine

ELISA spetsiifilisuse kontrollimiseks teostati võimalike autoantikehade inhibeerimise eksperiment. Interaktsiooni toimumise tuvastamiseks antigeeni ja antikeha vahel viidi läbi inhibitsioon A961 peptiidiga seerumilahjenduses 1:100-le. Selleks valmistati inhibitsiooni puhverlahus, kus A961 peptiidi kontsentratsioon PBS-puhverlahuses (vt. LISA) oli 200 µg/ml. Seerumilahjendusi inkubeeriti 30 min ja siis kanti plaadile. ELISA teostati samamoodi kui peatükis 2.2.4.

## 2.2.6 Statistilised analüüsid

Katsete tulemustest arvutati aritmeetiline keskmine kahe paralleelse katse vahel. Seejärel leiti igale seerumile vahe peptiidiga ja peptiidita kannu vahel, mis näitab autoantikehade spetsiifilist seondumist peptiidile. Arvutati seerumi ja kontrollseerumi omavaheline suhe ning saadud tulemustega viidi läbi ROC analüüs kasutades programmi GraphPad Prism 7. Leiti AUC kasutades 95% usaldusintervalli. Lähtudes suurimast tõenäosuste suhte (LR) väärtusest ja tundlikkuse ning spetsiifilisuse protsentidest, määrati piirväärtus (CO), millest kõrgemate väärtustega seerumid tähistati autoantikehi sisaldavateks. Katsetevaheline varieeruvus kontrollseerumite vahel arvutati järgneva valemiga: (standardhälve/aritmeetiline keskmine)\*100.

## **2.3 Tulemused**

### **2.3.1 Ensüümvahendatud immuunsorptsioonmeetodi optimeerimine**

#### **2.3.1.1 Plaadi otsene katmine peptiidiga**

Kasutati 96-kannulist Maxisorp plaati, kus nii seerumeid, kontrollseerumit kui ka sekundaarse antikeha kontrolli oli kaks paralleeli. Ükski eksperiment tulemust ei andud ehk kontrollid ja haiged ei olnud piisavalt eristatavad, mis väljendus kõikide katsete kõrges taustasignaalis. Tasutasignaali kõrvaldamiseks kasutati avidiini vahendusel peptiidi immobiliseerimist ja optimeeriti ELISA tingimusi.

#### **2.3.1.2 Peptiidi immobiliseerimine avidiini vahendusel**

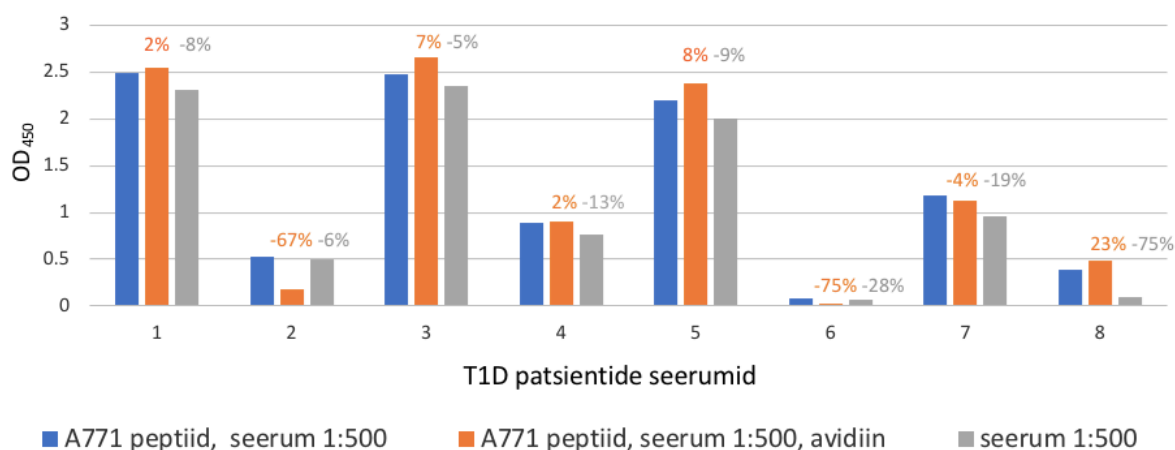
Plaadi otsene katmine peptiidiga ei andnud soovitud tulemusi ja seetõttu otsustati tahke kandja katta enne peptiidi avidiiniga. Avidiiniga kaetud plaadil toimub biotinüleeritud peptiidi orienteeritud seondumine ja seetõttu võib väiksema steerilise takistuse tõttu autoantikeha interaktsioon olla efektiivsem. Seerumis olevad autoantikehad pääsevad sellisel juhul lihtsamini peptiidiga interakteeruma.

#### **2.3.1.3 Mittespetsiifilise seondumise vähendamine**

*Soola lisamine puhverlahusele* – ELISA ei olnud kõrge taustasignaali tõttu edukas. Kirjandusest on teada, et NaCl lisamine puhverlahusele võib mittespetsiifilisi interaktsioone vähendada (Güven jt., 2014). Seega vähendati mittespetsiifilise interaktsioone 0,35 M NaCl kontsentratsiooniga pesupuhverlahuses.

*Avidiini mõju IgG antikehade mittespetsiifilisele seondumisele* – Plaat oli eelnevalt kaetud avidiiniga põhjusel, et biotinüleeritud peptiid A771 seondub sellisel juhul kannu põhja orienteeritult. Igal inimesel on tõenäoliselt erinev hulk avidiini vastaseid antikehasid, seetõttu teostati mittespetsiifiliste interaktsioonide vähendamiseks avidiini eelneva lisamisega seerumilahjendustele. Avidiini mõju mittespetsiifilisele seondumisele kirjeldab joonis 8.

## Avidiini mõju IgG antikehade mittespetsiifilisele seondumisele



**Joonis 8.** Avidiini mõju IgG antikehade mittespetsiifilisele seondumisele kasutades peptiidi A771. Abstsistteljel on erinevad T1D patsientide seerumid, kellel on tuvastatud ZnT8 vastased autoantikehad, ja ordinaatteljel on optiline tihedus ( $OD_{450}$ ). Sinine tulp kirjeldab eelnevalt avidiini ning A771 peptiidiga kaetud plaati ning sinna lisatud seerumilahjenduse 1:500-le tulemusi. Oranž tulp kirjeldab tulemusi seerumilahjenduse 1:500-le inkubatsioonil avidiiniga enne selle kandmist avidiini ning peptiidiga kaetud plaadile. Hall tulp kirjeldab tulemusi, kui seerumilahjendus 1:500-le on kantud peptiidita avidiiniga kaetud plaadile. Oranžid numbrid kirjeldavad olukorda, kuidas muutuvad tulemused, kui seerumit inkubeerida eelnevalt avidiinilahusega ehk mitu protsenti on teine tulp suurem/väiksem kui esimene tulp. Hallid numbrid tähistavad, mitu protsenti on kolmas tulp väiksem kui esimene ehk antud arvu absoluutväärtus kirjeldab spetsiifilist A771 peptiidist tingitud signaali. Kõikidel juhtudel oli sekundaarse antikeha mittespetsiifiline seondumine  $< 0,1$  OD.

Jooniselt 8 on näha, et kui avidiiniga katmise ja blokeerimise järgselt lisada ELISA plaadile vaid seerumilahjendust, saadakse peaaegu kõikidel juhtudel kõrge signaal. Kõrge signaal võib olla tingitud asjaolust, et inimestel on avidiiniga seonduvad antikehad. Lisades seerumilahjendusele avidiinilahust on näha, et iga seerumi puhul on muutus erinev. Tulemusi kirjeldab joonisel 8 näidatud erinevus oranži ja sinise tulba vahel. Efektiivse ELISA jaoks on oluline esimese ja kolmanda tulba vahe (joonis 8), mis näitab autoantikehade spetsiifilist seondumist A771 peptiidiga. Eksperimendist järeldub, et spetsiifiliselt peptiidile seonduvate autoantikehade detekteerimiseks on vaja teha igale seerumile oma kontroll. See võimaldab saadud tulemuste põhjal arvutada autoantikehast sõltumatu OD signaali tugevuse, millest omakorda saab järeldada spetsiifilise signaali suuruse.

*Sobiva blokeerimislahuse leidmine* – Esimese blokeerimislahusena katsetati 3%-list BSA-lahust, mis on üks kõige laialdasemalt kasutatud ELISA blokeerimislahus. See blokeerimislahus ei sobinud, madala singaali ja müra suhte tõttu, mis oli tingitud kõrge taustasignaalist. Kõrge taustasignaal on kõige tõenäolisemalt tingitud seerumis esinevate BSA-ga interakteeruvate antikehade olemasolust.

Järgmisena prooviti blokeerimislahusena 1%-list lõssipulbrilahust. See blokaator ei andnud soovitud tulemusi. Mittespetsiifiline interaktsioon võis olla tingitud asjaolust, et IgG antikehad interakteeruvad blokeerimislahusega. Kahe eelneva kasutatud blokaatori, nii BSA kui ka lõssipulbri, puhul on tegemist bioloogiliste ainetega ja seetõttu võivad uuritud seerumites esineda nende vastased antikehad, mille tõttu ei ole signaal eristatav esimest tüüpi diabeeti haigestunute ja kontrollide vahel.

Järgnevalt otsustati kasutada vähemtuntuid ELISA blokeerimislahuseid nii SAT1-te kui ka SAT2-te. Leiti, et SAT1-ga blokeerimisel on taustasignaali madalamad väärtused kui 3%-lise BSA-lahuse, 1%-lise lõssipulbrilahuse kui ka SAT2-e lahusega. SAT1-e efektiivsus väljendub asjaolus, et spektrofotomeetriga mõõdetud signaalide tugevused muutusid eristatavateks. Selle põhjuseks võib olla asjaolu, et SAT1 sisaldab polüvinüülpürrolidooni, millega on uuritavad tõenäoliselt vähem kokku puutunud kui eelnevate blokaatoritega ja seetõttu suure tõenäosusega ei esine neil isikutel eelnevalt nimetatud aine vastaseid antikehasid. Edasistes katsetustes kasutati blokeerimislahust SAT1.

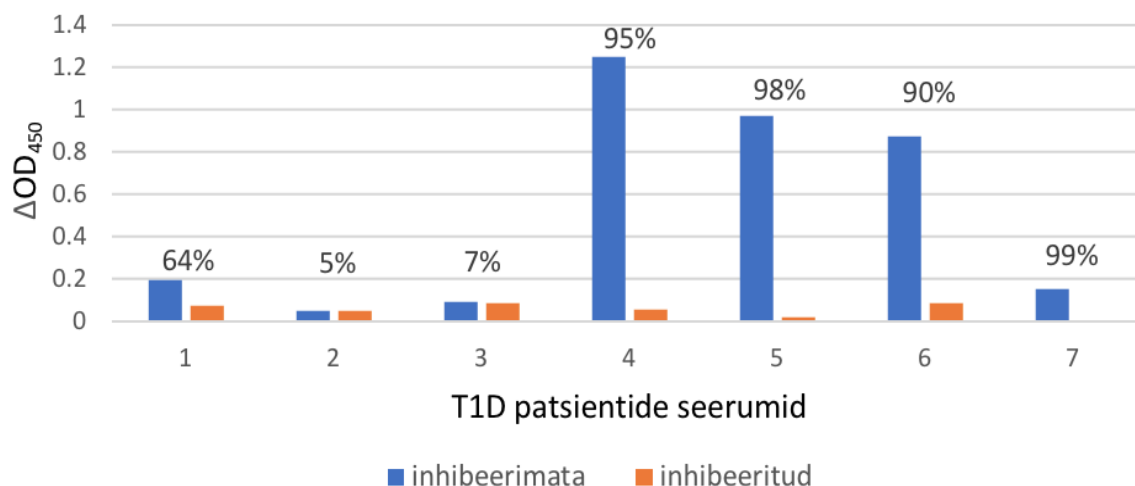
#### **2.3.1.4 Kontsentratsioonide ja ilmutamisaja optimeerimine**

Peptiidikontsentratsiooni 0,75 µg/ml ja 0,075 µg/ml võrdlusest järeldati, et kõrgema kontsentratsiooniga peptiidilahuse kasutamisel on seerumi signaalitugevus suurem. Seerumilahjenduste optimeerimistulemusena leiti, et lahjendus 1:100-le annab tugevama interaktsiooni kui 1:500-le. Ilmutamisaja optimeerimise võrdluse tulemusena leiti, et 10 minutit on piisav aeg, kuna 20 minutiga inkubatsioonil OD väärtus oluliselt ei muutunud. Ekspserimendi tulemusena osutus parimaks ELISA variant, kus A771 peptiidi kontsentratsioon oli 0,75 µg/ml, seerumilahendus 1:100-le ja ilmutamisaeg 10 minutit.

#### **2.3.2 Autoantikehade seondumise inhibeerimine**

Interaktsiooni toimumise tuvastamiseks antigeeni ja antikeha vahel viidi läbi inhibitsioon biotinüleerimata A961 peptiidiga seerumilahjenduses 1:100-le. Katsesse valiti seerumid, milles varasematele tulemustele tuginedes on teada kõrg ZnT8A kontsentratsiooni esinemine. Tulemusi kirjeldab joonis 9, mis võrdleb nii A961 peptiidiga inhibeeritud kui ka inhibeerimata autoantikehade seondumist plaadile immobiliseeritud A771 peptiidile.

## A961 peptiidiga inhibeeritud ja inhibeerimata autoantikehade seondumise võrdlus

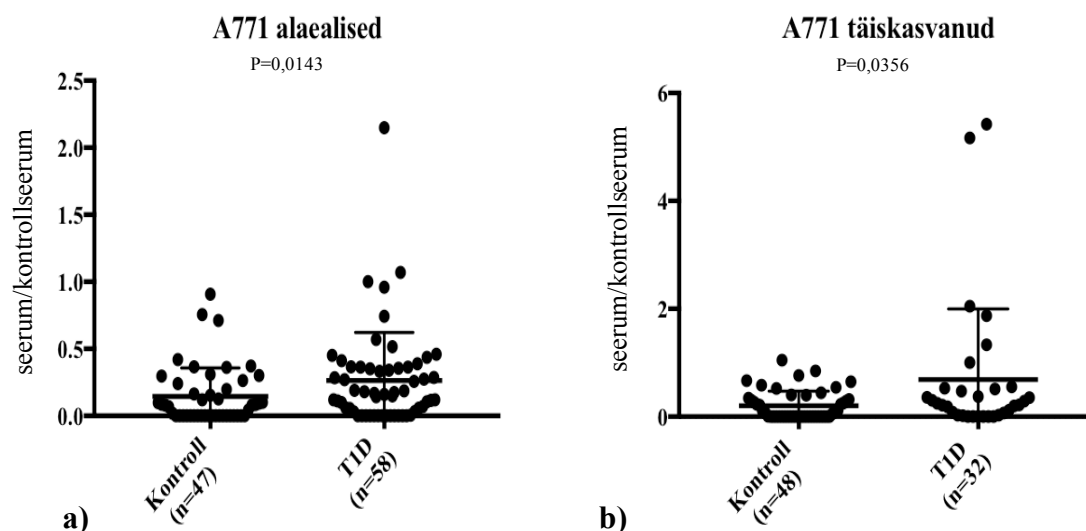


**Joonis 9.** A961 peptiidiga inhibeeritud ja inhibeerimata autoantikehade seondumise võrdlus. Abstsisseljel on erinevad T1D patsiendid, kellel on tuvastatud ZnT8 vastased autoantikehad, ja ordinaatteljel on optilise tiheduse vahe ( $\Delta OD_{450}$ ) A771 peptiidiga kannu ja peptiidita kannu vahel. Sinine tulp näitab autoantikehade seondumist avidiiniga kaetud plaadile ja oranž seondumise inhibeerimist samadel tingimustel. Protsendid tulpade kohal näitavad, kui palju väheneb A961 peptiidiga inhibeerides optiline tihedus.

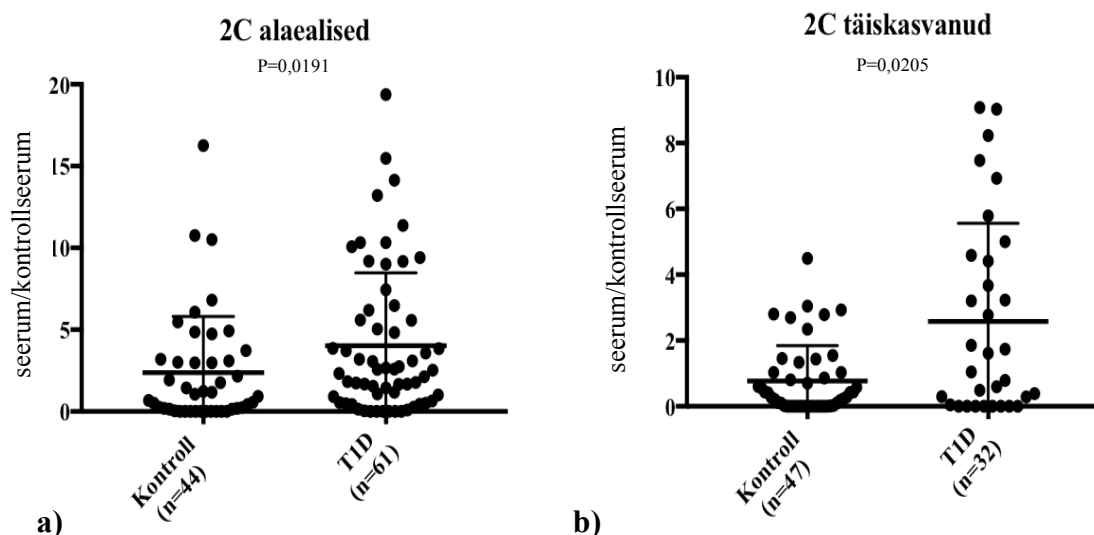
Jooniselt 8 järeldub, et keskmiselt on eelnevalt A961-ga inhibeeritud seerumilahjenduste  $\Delta OD$  65% väiksem kui inhibeerimata seerumilahjenduste korral. Suurim ja vähim vahe inhibeeritud ja inhibeerimata tulemuste vahel on vastavalt 99% ja 5%. Optilise tiheduse väärtus väheneb, kui enne ELISA plaadile kandmist inkubeerida seerumilahjendusi koos A961 peptiidiga. OD vähenemine on suure tõenäosusega tingitud asjaolust, et lahuses toimub interaktsioon antikeha ja antigeeni vahel. See võib olla tingitud aktiivtsentrite hõivatuses ning sellepärast ei saa plaadile kantud seerumilahjenduses olevad ZnT8 autoantikehad enam plaadil oleva antigeeniga interakteeruda. Eksperimendist järeldub, et kui enne ELISA plaadile kandmist inkubeerida seerumit A961 peptiidiga, toimub spetsiifiline interaktsioon peptiidi ja seerumilahjenduses esinevate ZnT8 antigeeni vahel.

### 2.3.3 Statistilised analüüsid

ZnT8 autoantikehade esinemist vaadeldi nii T1D diagnoositud isikute kui ka kontrollgrupi kahes vanusevahemikus: alaealistel (1–17 aastastel) ja täiskasvanutel (18–79 aastastel). Joonis 10 kirjeldab statistiliste analüüside järgselt saadud tulemusi, mis on tehtud A771 peptiidiga. Joonised 12 ja 13 esitavad tulemused, mis on saadud kasutades 2C peptiidi. Katsetesisene varieeruvus elimineeriti kasutades igale seerumile oma kontrolli. Katsetevaheline varieeruvus oli A771 testis 9% ja 2C peptiidiga testis 46%.

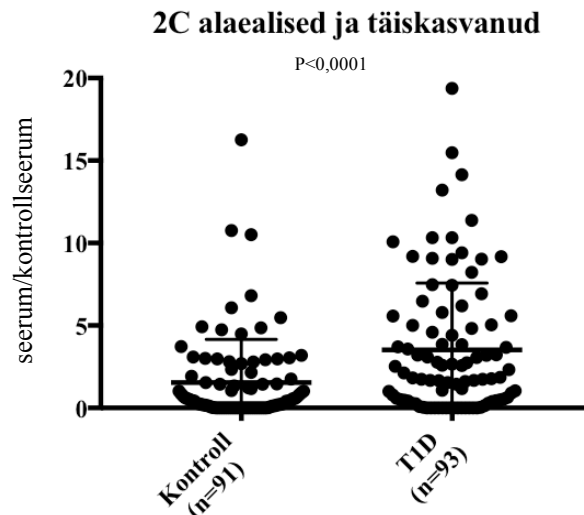


**Joonis 10.** Diagrammid kirjeldavad peptiidiga A771 leitud ZnT8A esinemist a) alaealistel ja b) täiskasvanutel. a) Kontroll (n=47) ja T1D (n=58) grupid 1–17 aastastel alaealistel kasutades A771 peptiidi  $P=0,0143$  ja  $AUC=0,6394$ . b) Kontroll (n= 48) ja T1D (n=32) võrdlusgrupid 18–79 aastastel täiskasvanutel kasutades A771 peptiidi  $P=0,0356$  ja  $AUC=0,6393$ .



**Joonis 11.** Diagrammid kirjeldavad peptiidiga 2C leitud ZnT8A a) alaealistel ja b) täiskasvanutel. a) Kontroll (n=44) ja T1D (n=61) võrdlusgrupid 1–17 aastastel alaealistel, kasutades 2C peptiidi  $P=0,0191$  ja  $AUC=0,6345$ . b) Kontroll (n=47) ja T1D (n=32) võrdlusgrupid 18–79 aastastel täiskasvanutel kasutades 2C peptiidi  $P=0,0205$  ja  $AUC=0,6543$ .





**Joonis 12.** Diagramm kirjeldab peptiidiga 2C leitud ZnT8A esinemist, kus kokku on võetud alaealiste ja täiskasvanute grupp. Kontroll 91 ja T1D patsiente 93  $P<0,0001$ ,  $AUC=0,6696$ .

ROC analüüsist saadud andmetele tuginedes määrati CO võttes arvesse suurimat LR väärtust ja tundlikkuse ning spetsiifilisuse protsenti. ROC analüüsist saadud ROC-kõvera graafikud on toodud LISA 2 all. LISA 2-st on leitavad veel määratud CO väärtused, sensitiivsuse ja spetsiifilisuse ning LR väärtused valitud piirväärtuse korral.

#### 2.3.4 ZnT8 IgG isotüüpi autoantikehade esinemise kokkulangemine testide ELISA A771 ja ELISA 2C tulemuste vahel

*ZnT8 IgG isotüüpi autoantikehade esinemise kokkulangemine alaealistel võrreldes testide ELISA A771 ja ELISA 2C tulemusi* – 94 isikuga viidi läbi nii ELISA A771 kui ka ELISA 2C test. 63 isikul 94-st kattus mõlema nii ELISA A771 kui ka ELISA 2C testi järgi autoantikehade esinemine või puudumine. 63-st isikul 30 inimesel (5 K, 25 T1D) esinesid mõlema testi järgi ZnT8 vastased autoantikehad ja 31 isikul (16 K, 14 T1D) need puudusid. 31 isikul 94-st olid nii ELISA A771 kui ka ELISA 2C tulemused erinevad, kus 22 isikul oli ELISA A771 test negatiivne, aga ELISA 2C test positiivne. Samas 9 isikul oli ELISA A771 test positiivne, aga ELISA 2C test ei tuvastanud autoantikehade olemasolu. Tulemused võtab kokku tabel 4.

*ZnT8 IgG isotüüpi autoantikehade esinemise kokkulangemine täiskasvanutel võrreldes testide ELISA A771 ja ELISA 2C tulemusi* – 79 isikuga viidi läbi nii ELISA A771 kui ka ELISA 2C test. 46 isikul 79-st kattus mõlema nii A771 kui ka 2C testi järgi autoantikehade esinemine või puudumine. 46-st isikust 8 uuritavaal (4 K, 4 T1D) esinesid ja 38 isikul (31 K, 7 T1D) ei esinenud ZnT8 autoantikehi. 33 isikul 79-st olid ELISA A771 ja ELISA 2C testide tulemused

erinevad. 16 isikul (4 K, 12 T1D) 33-st oli ELISA A771 test negatiivne samas ELISA 2C test positiivne, samas 17 isikul (8 K, 9 T1D) 33-st oli ELISA A771 test positiivne, aga ELISA 2C test ei tuvastanud autoantikehade olemasolu. Tulemused võtab kokku tabel 4.

**Tabel 4.** ELISA A771 ja ELISA 2C testiga saadud samade seerumite analüüsitulemuste võrdlus. ''+' ja ''-'' testi järel tähistavad vastavalt testi tulemustele ZnT8A olemasolu või puudumist. ''T1D'' tähistab esimest tüüpi diabeedi diagnoosiga ja ''Kontroll'' kontrollgruppi kuuluvaid uuritavaid.

Grupp Testid	Alaealised			Täiskasvanud		
	Kontroll	T1D	KOKKU	Kontroll	T1D	KOKKU
<b>A771 +; 2C +</b>	5	25	<b>30</b>	4	4	<b>8</b>
<b>A771 +; 2C -</b>	5	4	<b>9</b>	8	9	<b>17</b>
<b>A771 -; 2C +</b>	12	10	<b>22</b>	4	12	<b>16</b>
<b>A771 -; 2C -</b>	19	14	<b>33</b>	31	7	<b>38</b>
<b>KOKKU</b>	<i>41</i>	<i>53</i>	<b>94</b>	<i>47</i>	<i>32</i>	<b>79</b>

## **2.4 Arutelu**

### **2.4.1 SAT1 on efektiivne blokeerija ELISA testides**

Blokeerimislahus on oluline ennetamaks mittespetiifilist antikehade seondumist plaadile. ELISA-s kasutatakse blokaatoreid saavutamaks madalat taustasignaali. Optimaalne blokaator maksimaliseerib signaali ja müra suhte, samas ei tohi reageerida antikehadega ega anda ristreaktsioone. (Xiao ja Isaacs, 2012; Thermo Scientific, 2010) Enamjaolt kasutatakse ELISA-s blokaatoreid, milleks on näiteks BSA või lõssipulber, mõlemat kasutati ka käesolevas töös. Need blokaatorid on toiduainetes esinevad valgulised ained ning seetõttu võivad uuritavates seerumites esineda nende blokaatorite vastased antikehad. SAT1-e funktsiooni blokaatorina tagab polüvinüülpürrolidoon. Polüvinüülpürrolidooni eeliseks eelnevalt mainitud blokaatorite ees on asjaolu, et tegemist on vähem levinud manustatava mittevalgulise ainega ja seetõttu võib eeldada, et uuritavate isikute seerumites ei esine blokaatori vastaseid antikehi.

### **2.4.2 Individuaalne kontroll igale seerumile**

Enamjaolt kasutatakse ELISA testis ühte negatiivset kontrolli kõikide seerumite jaoks plaadil. Käesolevas töös kaeti plaat eelnevalt avidiiniga, mis võimaldab biotinüleeritud antigeeni seondumist orienteeritult ja seetõttu suurendab signaalitugevust. Avidiin esineb näiteks munavalges. Uuritavad seerumid võivad seetõttu sisaldada avidiini vastaseid antikehi, mille seondumisel plaadiga tekitada valepositiivseid tulemusi. Uuritavate seerumites erineva koguse avidiini vastaste antikehade esinemise tõttu ei saanud antud eksperimendis kasutada ühte negatiivset kontrolli, vaid tuli teha igale seerumile oma kontroll.

### **2.4.3 ZnT8 IgG isotüüpi autoantikehade esinemise kokkulangevuse erinevus ELISA A771 ja ELISA 2C tulemuste vahel**

Mõlema testiga saadi statistiliselt olulised tulemused ( $P < 0,05$ ), kuigi kaks testi ei kattu omavahel 100%. Peamine põhjus on arvatavasti seotud kahe erineva antigeeni kasutamisega. ELISA A771 testis kasutati lühemat 18 aminohappe pikkust ja positsioonis 325 arginiini sisaldavat peptiidi ja ELISA 2C puhul pikemat kahe 102 aminohappe pikkust ja siduva peptiidiga ühendatud antigeeni, kus ühel juhul oli positsioonis 325 arginiin ja teisel juhul

trüptofaan. Kirjandusest on teada, et R<sub>325</sub> sisaldav antigeen peaks tuvastama umbes 53% vastavaid autoantikehasid (Wenzlau jt., 2008).

Käesolevas magistritöös tuvastati IgG isotüüpi autoantikehade ELISA A771 ja ELISA 2C testi kokkulangevuseks (tabel 4) alaealistel 67% (63 uuritavaal 94-st) ja täiskasvanutel 58% (46 uuritavaal 79-st). Kaks testi annavad erinevaid tulemusi: alaealistel 33% (31 uuritavaal 94-st) ja täiskasvanutel 42% (33 uuritavaal 79-st) juhtudest.

Juhtumeid, kus ELISA A771 test ei tuvasta, aga ELISA 2C test tuvastab autoantikehade olemasolu, on alaealistel 23% (22 isikul 94-st) ja täiskasvanud 20% (16 isikul 79-st) uuritavatest. ELISA A771 test on negatiivne ja ELISA 2C test positiivne 10 alaealisel ja 12 täisealisel T1D patsiendil. Kahe testi erinevus võib olla tingitud põhjusest, et 2C positiivsetel isikutel esinevad ZnT8R vastaste autoantikehade asemel ZnT8WA-d. Tõenäoliselt saab nendel isikutel ZnT8 autoantikehade olemasolu tuvastada, lisades A771 peptiidile siduva järjestusega sama pika peptiidi, erinevusega vaid 325. positsioonis, kus oleks trüptofaan. Kontrollide hulgas oli samuti juhtumeid, kus ELISA A771 test ei tuvastanud, aga ELISA 2C test tuvastas autoantikehade olemasolu. Eelnev võis olla tingitud liiga madalast CO väärtusest 2C testi korral.

Juhtumeid, kus ELISA A771 test tuvastab, aga ELISA 2C test ei tuvasta autoantikehade olemasolu, on alaealistel 10% (9 isikul 94-st) ja täiskasvanutel 22% (17 isikul 79-st) uuritavatest (17 isikul 79-st). Eelnev võis olla tingitud kas A771 testi ja/või 2C testi CO väärtuse ebaõigest määramisest.

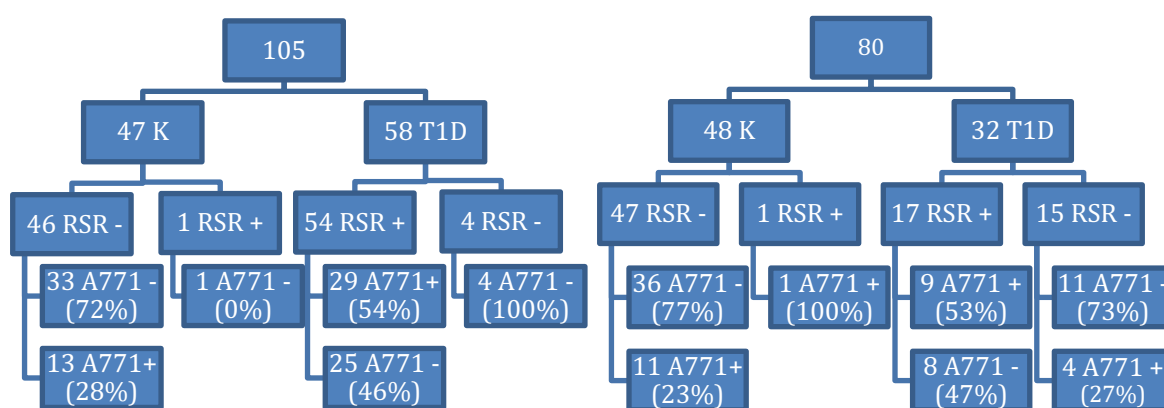
#### **2.4.4. ZnT8 autoantikehade esinemise kokkulangemine ELISA A771 ja ElisaRSR™ ZnT8 Ab™ testi tulemuste vahel**

ZnT8 autoantikehade esinemist vaadeldi nii T1D diagnoositud isikute kui ka kontrollgrupi kahes vanusevahemikus: alaealistel (1–17 aastastel) ja täiskasvanutel (18–79 aastastel). Joonis 10 kirjeldab statistilisest analüüsist saadud tulemusi, mis on tehtud A771 peptiidiga. ZnT8 vastased autoantikehad määrati ElisaRSR™ ZnT8 Ab™ testiga uurimisgrupi teiste liikmete poolt.

*Autoantikehade esinemise kokkulangemine alaealistel* – Kokku oli 105 last, kellest 47 olid diagnoosi järgi kontrollid ja 58 esimest tüüpi diabeeti haigestunud. Tulemused võtab kokku joonis 13a. 47 kontrollgruppi kuuluvast isikust tuvastati kliinilises praktikas kasutatava ElisaRSR™ ZnT8 Ab™ testiga, et nendest 46-l ei esine ZnT8A, samas kui 1 isikul tuvastati autoantikehade olemasolu. 46 kontrollgruppi kuuluvast ja ElisaRSR™ ZnT8 Ab™ testiga autoantikehasid mitteomavatest isikutest 13 inimesel esinesid ning 33 puudusid ZnT8A-d

kasutades ELISA A771 testi. 58 T1D patsiendist esinevad ZnT8 vastased autoantikehad 54 haigel ja 4 inimesel puudusid need ElisaRSR™ ZnT8 Ab™ testi järgi. 4 isikul, kellel ElisaRSR™ ZnT8 Ab™ järgi autoantikehad puudusid, ei tuvastatud neid ka ELISA A771 testiga. ElisaRSR™ ZnT8 Ab™ test tuvastas 54 isikul ZnT8A, kellest 29 isikul (54%) esinevad need ka ELISA A771 testi järgi.

*Autoantikehade esinemise kokkulangemine täiskasvanutel* – Kokku oli 80 täiskasvanut, kellest 48 isikut olid diagnoosi järgi kontrollid ja 32 esimest tüüpi diabeeti haigestunud. Tulemused võtab kokku joonis 13b. Täiskasvanute grupis oli kontrollle 48. 47 isikul puudusid ElisaRSR™ ZnT8 Ab™ testi järgi ZnT8A, nendest 36 isikul ei esinenud ei ElisaRSR™ ZnT8 Ab™ testi ega ka ELISA A771 testi järgi ZnT8 autoantikehasid ja 11 isikul esinesid. 1 isikul, kellel ElisaRSR™ ZnT8 Ab™ testi järgi esinesid autoantikehad, oli ELISA A771 testi järgi CO väärtus samuti positiivne. 32-st esimest tüüpi diabeeti haigestunud täiskasvanust olid 17 ElisaRSR™ ZnT8 Ab™ testi järgi positiivsed, kellest 9-l (53%-l) esinesid ja 8-l puudusid ELISA A771 järgi ZnT8 autoantikehad. 15-st ElisaRSR™ ZnT8 Ab™ testi tulemuse järgi negatiivsest isikust ei esine autoantikehi ELISA A771 testi kasutades 11-l, samas kui 4 isikul tuvastatakse ZnT8A olemasolu.



**Joonis 13.** ELISA A771 (joonisel tähistatud A771), mis on teostatud A771 peptiidiga, võrdlus ElisaRSR™ ZnT8 Ab™ (joonisel tähistatud kui RSR) testi tulemustega. Vasakul olev a) diagramm kirjeldab alaealiste ja paremal b) täiskasvanute testi tulemuste kokkulangevusi. Number tähistab inimeste arvu. “K” ja “T1D” tähistavad vastavalt kontrollle ja esimest tüüpi diabeedi patsiente. “+” ja “-” testi järel tähistavad vastavalt testi tulemustele ZnT8A olemasolu või puudumist. Sulgudes olev protsent tähistab ELISA A771 testi kokkulangevust ElisaRSR™ ZnT8 Ab™ testiga.

*ELISA A771 ja ElisaRSR™ ZnT8 Ab™ tulemuste omavaheline kattuvus* – Alaealiste seerumeid analüüsides ElisaRSR™ ZnT8 Ab™ ja ELISA A771 testi tulemused kattuvad 72% kontrollidest, kus mõlemad testid tuvastavad, et isikutel ei ole ZnT8 autoantikehasid, ja 54%

T1D patsientidest, kus mõlemad testid tuvastavad, et isikutel esinevad ZnT8 autoantikehad. Täiskasvanute seerumeid analüüsides ElisaRSR™ ZnT8 Ab™ ja ELISA A771 testid kattuvad 77% kontrollidest, kus mõlemad testid tuvastavad, et isikutel ei ole ZnT8 autoantikehasid, ja 53% T1D patsientidest, kus mõlemad testid tuvastavad, et isikutel esinevad ZnT8 autoantikehad. Kahe testi mittekattuvus võib olla tingitud asjaolust, et ELISA A771 detekteerib ainult R<sub>325</sub> spetsiifilisi autoantikehasid, mida on populatsioonis, Wenzlau ja tema kolleegide poolt 2008 aastal pubitseeritud artikli järgi, ligikaudu 53%. Lisaks eelnevale näitab ElisaRSR™ ZnT8 Ab™ test R<sub>325</sub> ja W<sub>325</sub> spetsiifilistele IgG klassi autoantikehadele lisaks IgM ja IgA isotüüpi autoantikehasid. Tulemuste omavahelist ebakooskõla võis mõjutada ka seerumite korduv külmutamine ja sulatamine enne ELISA A771 analüüsi, samas kui ElisaRSR™ ZnT8 Ab™ ELISA teostati seerumitest, mida oli külmutatud maksimaalselt 1–2 korda.

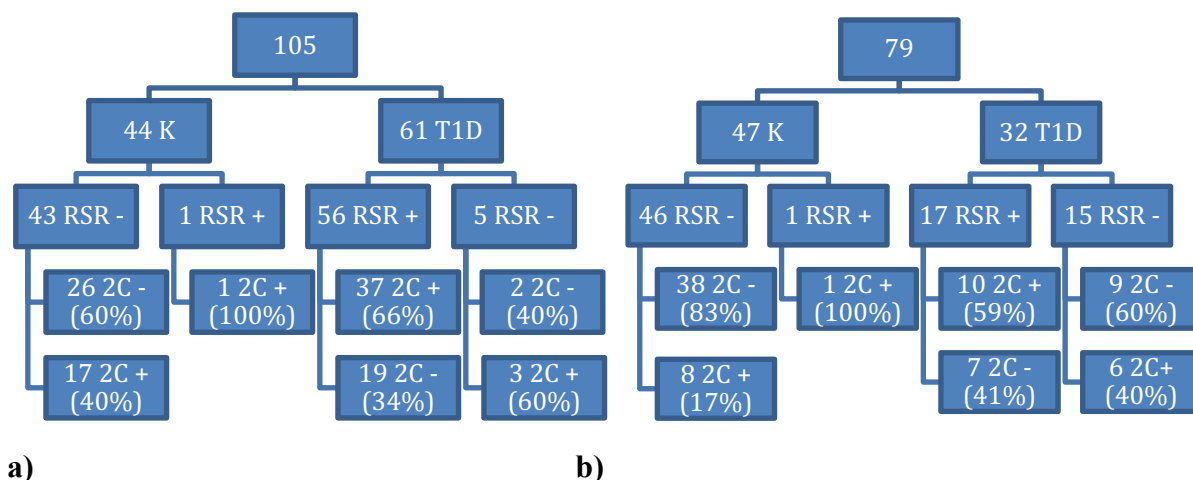
#### **2.4.5. ZnT8 autoantikehade esinemise kokkulangemine ELISA 2C ja ElisaRSR™ ZnT8 Ab™ testi tulemuste vahel**

ZnT8 autoantikehade esinemist vaadeldi nii T1D diagnoositud isikute kui ka kontrollgrupi kahes vanusevahemikus: alaealistel (1–17 aastastel) ja täiskasvanutel (18–79 aastastel). Joonised 11 ja 12 kirjeldavad statistilistest analüüsist saadud tulemusi, mis on tehtud 2C petiidiga.

*Autoantikehade esinemise kokkulangemine alaealistel* – Alaealiste grupis oli 105 uuritavat, kellest olid 44 kontrollid ja 61 T1D patsiendid. Tulemused võtab kokku joonis 14a. Kontrollidest ei esinenud ZnT8 autoantikehad ElisaRSR™ ZnT8 Ab™ testi järgi 43 uuritaval, kellest 26 ei esine autoantikehasid ELISA 2C testi järgi. 17 isikul 43-st esinesid autoantikehad tuginedes ELISA 2C testile. 1 isik on nii ElisaRSR™ ZnT8 Ab™ testi kui ka ELISA 2C testi järgi positiivne. 61 esimest tüüpi diabeeti põdevast alaealistest patsiendist oli ElisaRSR™ ZnT8 Ab™ testi järgi 56 ZnT8A positiivsed, kellest 37 oli seda ka ELISA 2C testi järgi. 56-st T1D isikust 19 alaealist oli ELISA 2C testi järgi negatiivsed. 5 T1D patsiendist, kes olid ElisaRSR™ ZnT8 Ab™ testiga negatiivsed, 2 isikut olid ka ELISA 2C testi järgi negatiivsed.

*Autoantikehade esinemise kokkulangemine täiskasvanutel* – Täiskasvanute grupis oli kokku 79 uuritavat, kellest kontrolle 47 ja T1D patsiente 32. Tulemused võtab kokku joonis 14b. 47 kontrollist ei esinenud ElisaRSR™ ZnT8 Ab™ testi järgi ZnT8 autoantikehasid 46 isikul, kellest 38 uuritaval ei esinenud neid ka ELISA 2C testiga. 1 kontroll, kes oli ElisaRSR™ ZnT8 Ab™ testiga positiivne, oli seda ka ELISA 2C testiga. 32 patsiendil esines esimest tüüpi diabeet, kellest 17 isikul tuvastati ElisaRSR™ ZnT8 Ab™ testiga autoantikehad. Nendest 17

isikust 10 uuritaval esinesid ja 7 inimesel puudusid ZnT8A-d kasutades ELISA 2C testi. 15 esimest tüüpi diabeeti põdevast isikust, kellel ei esinenud ElisaRSR™ ZnT8 Ab™ testi järgi ZnT8 autoantikehasid, ei esinenud neid ELISA 2C testi järgi 9 isikul, samas kui 6 isikul tuvastati autoantikehade olemasolu.



**Joonis 14.** ELISA 2C (joonisel tähistatud 2C), mis on teostatud 2C peptiidiga, võrdlus ElisaRSR™ ZnT8 Ab™ (joonisel tähistatud kui RSR) testi tulemustega. Vasakul olev a) diagramm kirjeldab alaealiste ja paremal b) täiskasvanute testi tulemuste kokkulangevusi. Arv tähistab inimeste arvu. “K” ja “T1D” tähistavad vastavalt kontrolle ja esimest tüüpi diabeedi patsiente. “+” ja “-” testi järel tähistavad vastavalt testi tulemustele kas ZnT8A olemasolu või puudumist. Sulgudes olev protsent tähistab ELISA 2C testi kokkulangevust ElisaRSR™ ZnT8 Ab™ testiga.

*ELISA 2C ja ElisaRSR™ ZnT8 Ab™ testi tulemuste omavaheline kattuvus* – Leitud on, et R<sub>325</sub> spetsiifilisi ZnT8 autoantikehi esineb 53% ja W<sub>325</sub> spetsiifilisi on 44%, koos moodutavad need 97% ZnT8 vastastest autoantikehadest (Wenzlau jt., 2008). ELISA 2C test tuvastas ElisaRSR™ ZnT8 Ab™ testiga võrreldes alaealiste T1D patsientide puhul 34% ning täiskasvanute puhul 41% valenegatiivseid tulemusi (joonis 14). Esiteks, võib erinevus olla tingitud asjaolust, et ElisaRSR™ ZnT8 Ab™ kasutab kihelist ELISA-t, samas kui käesolevas magistritöös kasutati otsest ELISA-t. Teiseks, võib erinevus olla tingitud erinevatest testi poolt detekteeritavatest autoantikeha isotüüpidest. Kliinilises praktikas olev RSR firma test tuvastab lisaks IgG-le ka IgA ja IgM klassi autoantikehasid, samas kui ELISA 2C detekteerib ainult IgG-d. Seega oleks oluline uurimisobjekt edaspidiseks ka ZnT8 vastased IgM ja IgA klassi autoantikehad. Kolmandaks võib erinevus olla tingitud sellest, et ELISA 2C testis kasutati seerumeid, mida oli sulatatud mitmeid kordi. Enne ELISA 2C testi tegemist oli seerumeid külmutatud ja sulatatud vastavalt kindlale seerumile 5 kuni 20 korda. Samas kui ElisaRSR™ ZnT8 Ab™ test sooritati seerumitest, mida oli külmutatud ja sulatatud maksimaalselt 1 või 2 korra. Külmutamine ja sulatamine võib kahjustada auto-antikehasid põhjustades agregeerumist

ja seeläbi muutes need inaktiivseks. Neljandaks, erinevuse põhjustajaks võib olla, et 2C antigeen sisaldab tõenäoliselt maltoosi siduvat valku, mis esineb *E.coli*-s. Sellest tingituna võivad uuritavatel olla tekkinud selle valgu vastased antikehad, mis võivad tekitada valepositiivset tulemust nii kontrollide kui ka T1D patsientide seas. Viiendaks, võib erinevus ELISA 2C ja ElisaRSR™ ZnT8 Ab™ testi tulemustes tuleneda liiga madalast 2C testi puhul määratud CO väärtusest. CO liiga madala väärtuse tõttu annab test palju valenegatiivseid vastuseid.

#### **2.4.6. ZnT8 IgG isotüüpi autoantikehade kokkulangemine ELISA A771 ja LIPS testi tulemuste vahel**

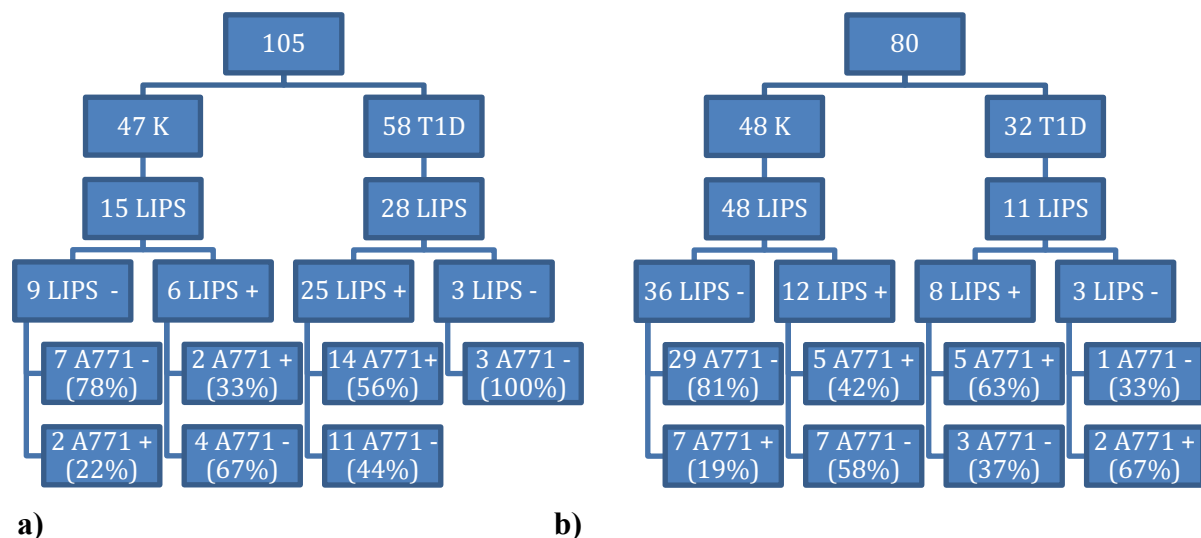
ZnT8 autoantikehade esinemist vaadeldi nii T1D diagnoositud isikute kui ka kontrollgrupi kahes vanusevahemikus: alaealistel (1–17 aastastel) ja täiskasvanutel (18–79 aastastel). Joonis 10 kirjeldab statistilisest analüüsist saadud tulemusi, mis on tehtud A771 petiidiga. Kõik LIPS testiga analüüsitud proovid teostas Julia Ustinova enne 2014 aastat.

*Autoantikehade esinemise kokkulangemine alaealistel* – Alaealiste grupis oli 105 uuritavat, kellest olid 47 kontrollid ja 58 T1D patsiendid ning kellest LIPS oli tehtud vastavalt 16 ja 28 isikul. Tulemused võtab kokku joonis 15a. 47 kontrollil oli LIPS tehtud 15 isikul, kellest 9 isikut olid LIPS-i järgi ZnT8A negatiivsed ja 6 isikut ZnT8A positiivsed. LIPS testiga ei esine 9 isikul ZnT8A-d ning nendest 7 isikul ei esine neid A771 testi kasutades. 6 kontrollist, kes olid LIPS positiivsed, esinesid 2 isikul ELISA A771 testi järgi autoantikehad. 58-l T1D patsiendist oli LIPS tehtud 28 isikul, kellest 25-l esinevad ja 3-l puuduvad ZnT8A selle testi põhjal. 25-st LIPS positiivsest isikust 14-l esinesid autoantikehad ka ELISA A771 testi kasutades. 3 isikul, kellel LIPS test autoantikehasid ei tuvastanud, puudusid need ka ELISA A771 testiga.

*Autoantikehade esinemise kokkulangemine täiskasvanutel* – Täiskasvanute grupis oli 80 uuritavat, kellest olid 48 kontrollid ja 32 T1D patsiendid ning kellest LIPS oli tehtud vastavalt 48 ja 11 isikul. Tulemused võtab kokku joonis 15b. 48 uuritavast kontrollisiku proovist ei esinenud ZnT8 vastaseid autoantikehasid LIPS testiga 36 isikul, kellest 29 isikul ei esinenud neid ka ELISA A771 testiga. LIPS testiga 36 negatiivsest isikust 7-l esinesid A771 testi järgi autoantikehad. 12-l LIPS testi järgi positiivsest kontrollgruppi kuuluvast isikust esinesid ELISA A771 testiga 5 isikul ja puudusid 7 uuritaval autoantikehad. 32-l T1D patsiendil oli LIPS test tehtud 11 isikul, kellest 8-l oli test positiivne ja 3-l oli test negatiivne. 8 T1D patsiendist ja LIPS testi järgi positiivsest isikust 1 haigel ei esinenud ja 2 isikul esinesid autoantikehad kasutades



ELISA A771 testi. Nendest 8-st 5-l esinesid ja 3-l puudusd autoantikehad kasutades ELISA A771 testi.



**Joonis 15.** ZnT8A esinemine a) alaealistel ja b) täiskasvanutel võrreldes ELISA A771 ning LIPS testi tulemusi. Arv tähistab inimeste arvu. “K” ja “T1D” tähistavad vastavalt kontrolle ja esimest tüüpi diabeedi patsiente. “+” ja “-” testi järel tähistavad vastavalt testi tulemustele ZnT8A olemasolu või puudumist. Protsent sulgudes tähistab ELISA A771 ja LIPS testi omavahelist võrldust.

*ELISA A771 ja LIPS testi tulemuste omavaheline kattuvus* – LIPS ja ELISA A771 tuvastavad mõlemad IgG isotüüpi autoantikehasid. Testid kattuvad alaealistel 78% ja täiskasvanutel 81% juhtudest, kus mõlemad testid tuvastavad, et kontrollidel ei esine ZnT8 autoantikehasid. T1D uuritavatest kattuvad kaks testi alaealistel 56% ja täiskasvanutel 63%, kus mõlemad testid näitavad, et isikutel esinevad autoantikehad (joonis 15). 56% ja 63% on peaaegu kattuvad eelnevalt näidatud R<sub>325</sub> sisaldava antigeeniga interakteeruvate autoantikehade esinemissagedusega. Esiteks võib kahe testi erinevus olla tingitud asjaolust, et LIPS test mõõdab nii R<sub>325</sub> kui W<sub>325</sub> spetsiifilisi variante, aga ELISA A771 vaid R<sub>325</sub> spetsiifilisi variante. Arvatavasti muutuksid ELISA A771 ja LIPS testi tulemused omavahel kattuvamateks, kui lisada A771 peptiidile siduva järjestusega sama pikk osa, kus 325 positsioonis on trüptofaan. Teiseks võib erinevus olla tingitud asjaolust, et LIPS test teostati vähemalt 3–4 aastat enne kui ELISA A771 test, mistõttu võib uuritav materjal külmutamise ja sulatamise tõttu olla erinev.

#### **2.4.7 18 aminohappe pikkune ja positsioonis 325 arginiini sisaldav (ah<sub>324</sub>–R<sub>325</sub> –...–ah<sub>341</sub>) peptiid kui peamine epitoop ZnT8A tuvastamisel**

Kindlad epitoobid on olulised prognoosimaks beetarakkude hävitamist esimest tüüpi diabeedi korral, seetõttu on oluline nende kaardistamine. Sünteesitud ZnT8 ah<sub>318</sub>–ah<sub>331</sub> peptiidiga on näidatud, et sellega ei seonu inimese ZnT8 autoantikehad. Teada on, et ei ZnT8RA ega ka ZnT8WA seonu ZnT8 ah<sub>318</sub>–ah<sub>331</sub> peptiidiga. Samad teadlased näitasid, et pikem *in vitro* transleeritud ZnT8 ah<sub>268</sub>–ah<sub>369</sub> valk on võimeline interakteeruma ZnT8A-ga, mis kinnitab, et see valgujärjestus sisaldab peamist ZnT8 epitoopi. Skärstrand ja tema meeskond oletasid, et 325 epitoop on tõenäoliselt sõltuv aminohappe jääkidest, mis ulatuvad välja nende katses olnud ah<sub>318</sub>–ah<sub>331</sub> peptiidist. (Skärstrand jt., 2013) Lisaks positsioonis 325 oleva aminohappe olulisusest epitoobis on tähtsad veel R<sub>332</sub>, E<sub>333</sub>, K<sub>336</sub> ja K<sub>340</sub> aidates kaasa suurema epitoobi tekkele ZnT8 C-terminaalses otsas (Wenzlau jt., 2011). Need aminohapped olid käesoleva töö ekperimentide peptiidides olemas.

Eelnevalt sõnastatud teadmiste ja käesolevast tööst saadud tulemuste kombinatsioonil võib kinnitada, et pigem on epitoobi määramisel oluline positsioonist 325 C-terminaalse otsa poole jäävad aminohapped kui positsioonid, mis jäävad sellest N-terminaalse otsa poole. Käesolevas magistritöös leiti, et ZnT8 autoantikehad on võimelised ära tundma ka lühemat 18 aminohappe pikkust ah<sub>324</sub> – R<sub>325</sub> – ... – ah<sub>341</sub> peptiidi, mis sisaldab eelnevalt kirjeldatud peamist antigeenset epitoopi.

## 2.5 Järeldused

Käesoleva magistritöö eksperimentaalse osa sooritamise ja sealt saadud tulemuste analüüsil jõuti järgnevatele järeldustele:

1. 18 aminohappe pikkust ja positsioonis 325 arginiini sisaldavat peptiidi ( $S_{324}-R_{325}-D_{326}-S_{327}-Q_{328}-V_{329}-V_{330}-R_{331}-R_{332}-E_{333}-I_{334}-A_{335}-K_{336}-A_{337}-L_{338}-S_{339}-K_{340}-S_{341}$ ) on võimalik kasutada ZnT8 autoantikehade määramisel;
2. ElisaRSR™ ZnT8 Ab™ ja ELISA A771 testi tulemused kattusid alaealistel (1–17 aastastel) uuritavatel:
  - ❖ 72% juhtudest, kus mõlemad testid tuvastasid, et kontrollidel ei esinenud ZnT8 autoantikehasid;
  - ❖ 54% juhtudest, kus mõlemad testid tuvastasid, et T1D patsientidel esinesid ZnT8 autoantikehad.
3. ElisaRSR™ ZnT8 Ab™ ja ELISA A771 testi tulemused kattusid täisealistel (18–79 aastastel) uuritavatel:
  - ❖ 77% juhtudest, kus mõlemad testid tuvastasid, et kontrollidel ei esinenud ZnT8 autoantikehasid;
  - ❖ 53% juhtudest, kus mõlemad testid tuvastasid, et T1D patsientidel esinesid ZnT8 autoantikehad.
4. LIPS ja ELISA A771 testi tulemused kattusid alaealistel (1–17 aastastel) uuritavatel:
  - ❖ 78% juhtudest, kus mõlemad testid tuvastasid, et kontrollidel ei esinenud ZnT8 autoantikehasid;
  - ❖ 56% juhtudest, kus mõlemad testid tuvastasid, et T1D patsientidel esinesid ZnT8 autoantikehad.
5. LIPS ja ELISA A771 testi tulemused kattusid täisealistel (18–79 aastastel) uuritavatel:
  - ❖ 81 % juhtudest, kus mõlemad testid tuvastasid, et kontrollidel ei esinenud ZnT8 autoantikehasid;
  - ❖ 63% juhtudest, kus mõlemad testid tuvastasid, et T1D patsientidel esinesid ZnT8 autoantikehad.

## KOKKUVÕTE

Käesoleva magistritöö ülesandeks oli välja selgitada lühikese 18 aminohappe pikkuse ja peamisele epitoobile vastava peptiidi ZnT8 kasutamise võimalikkus IgG klassi kuuluvate autoantikehade tuvastamiseks esimest tüüpi diabeeti haigestunud isikutel. Uurimismeetodina kasutati ensüümvahendatud immuunsorptsioonmeetodit. Saadud tulemusi võrreldi enamikes testides kasutatava pikema peptiidiga teostatud analüüside tulemustega. Lisaks eelnevale hõlmas töö saadud resultaate komparatsiooni kliinilises praktikas kasutatava ElisaRSR™ ZnT8 Ab™ testi ning ZnT8 autoantikehasid tuvastava lutsiferaasi immunopretsipitatsiooni süsteemiga tehtud testi resultaatidega.

Töö tulemusena leiti, et 18 aminohappe pikkust ja positsioonis 325 arginiini sisaldavat (ah<sub>324</sub> –R<sub>325</sub> –...–ah<sub>341</sub>) peptiidi on võimalik rakendada ZnT8 autoantikehade määramisel praktiliselt sama edukalt kui peamiselt antigeenina kasutatavat peptiidi. Esimest tüüpi diabeedi diagnoosiga ElisaRSR™ ZnT8 Ab™ testi tulemusel tuvastab uuritud peptiid autoantikehasid alaealistel 54%-l ja täiskasvanutel 53%-l ZnT8A positiivsetest patsientidest ning see leid kattub varem leitud R<sub>325</sub> spetsiifiliste autoantikehade esinemissagedusega. ZnT8 autoantikehade esinemine ühtib 56% alaealistest ja 63% täiskasvanutest T1D patsientidest nii uuritud peptiidi sisaldava testi kui ka lutsiferaasi immunopretsipitatsiooni süsteemiga tehtud testi tulemusega. Seega on võimalik saadud teadmisi kasutada edasises arenduses töötamaks välja ZnT8 autoantikehade tuvastamise meetodit inimese seerumist.

Esmane edasine perspektiiv oleks positsioonis 325 nii arginiini kui trüptofaani sisaldava liitpeptiidi süntees ja samade seerumite analüüs, rakendades käesolevas töös kasutatud meetodit. Liitpeptiidi järjestus oleks järgnev: biotiin – S<sub>324</sub> –R<sub>325</sub> – D<sub>326</sub> – S<sub>327</sub> – Q<sub>328</sub> – V<sub>329</sub> – V<sub>330</sub> –R<sub>331</sub>– R<sub>332</sub> – E<sub>333</sub> – I<sub>334</sub> – A<sub>335</sub> – K<sub>336</sub> –A<sub>337</sub> – L<sub>338</sub> – S<sub>339</sub> – K<sub>340</sub> – S<sub>341</sub> ~ S<sub>324</sub> –W<sub>325</sub> – D<sub>326</sub> – S<sub>327</sub> – Q<sub>328</sub> – V<sub>329</sub> – V<sub>330</sub> –R<sub>331</sub>– R<sub>332</sub> – E<sub>333</sub> – I<sub>334</sub> – A<sub>335</sub> – K<sub>336</sub> –A<sub>337</sub> – L<sub>338</sub> – S<sub>339</sub> – K<sub>340</sub> – S<sub>341</sub>. Selle analüüsi järgselt saab teha täpsemaid järeldusi väljatöötatud ELISA efektiivsuses ZnT8 autoantikehade tuvastamiseks esimest tüüpi diabeeti haigestunud isikutel. Võib oletada, et lisaks ZnT8 vastastele IgG isotüübi autoantikehadele võivad patsientidel esineda ka IgA ja IgM klassi autoantikehad. Seetõttu oleks järgmine edasine perspektiiv täiustada väljatöötatud ELISA-t ka nende klasside efektiivseks määramiseks. Eelnevalt kirjeldatud kahe perspektiivi eduka kombinatsiooni tulemusena võib loodetavasti tulevast väljatöötatud ELISA-t rakendada kliinilises diagnostikas.

# **ZnT8 autoantibodies in type 1 diabetes patients and their determination in sera using enzyme-linked immunosorbent assay**

Janet Tamm

## **SUMMARY**

Type 1 diabetes (T1D) is an autoimmune disease, which develops as a result of destruction of endocrine pancreatic beta cells. It is known that there is a strong correlation between the presence of islet cells autoantibodies and development of type one diabetes. Years before diagnosing the type 1 diabetes it is possible to predict the disease by detecting anti- $\beta$ -cell autoantibodies in the blood serum, which can remain active after diagnosing diabetes. In clinical practice autoantibodies are biomarkers through which autoimmunity is assessed. One of the most important autoantibodies for diagnosing type 1 diabetes are ZnT8 autoantibodies (ZnT8A). Since identifying ZnT8 as a type 1 diabetes autoantibody there have been attempts to develop tests for detecting it. Tests based on detecting autoantibodies have future prospects for early discovery of autoimmune diseases as well as predicting their development. When developing tests based on autoantibodies it is important to detect the epitope of the antigene. Determining epitope accurately enables developing a more effective analysis.

In this master's thesis the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to assess how well the part of ZnT8 epitope, which is 18 amino acids long (with R<sub>325</sub> specificity) describes the ZnT8 epitope in comparison with the longer 102 amino acid epitope (with R<sub>325</sub> and W<sub>325</sub> specificity) which is primarily used in other tests. GraphPad Prism 7 was used for statistical analysis. Based on results from statistical analysis a cutoff value was determined. The obtained results were compared with the results of the ElisaRSR™ ZnT8 Ab™ test, that is available in clinical practice, and the ZnT8A luciferase immunoprecipitation system test.

It was discovered that the peptide A771 (aa<sub>324</sub>–R<sub>325</sub>–...–aa<sub>341</sub>), which is 18 amino acids long and contains arginine in position 325 can be used for determining ZnT8 autoantibodies. The ElisaRSR™ ZnT8 Ab™ and ELISA A771 tests results overlap for 54% of minors and 53% of adults both tests detect T1D patients with ZnT8 autoantibodies. This 53% figure matches the previously found R<sub>325</sub>-specific autoantibody incidence rate. The ZnT8A LIPS and A771 tests results overlapped for 56% of minors and 63% of adults, where both tests detected T1D patients with ZnT8 autoantibodies. Therefore, the results obtained can be used in further development to create assay for detecting ZnT8 autoantibodies from human serum.

The primary further perspective would be to use fusion protein: biotin – S<sub>324</sub> – R<sub>325</sub> – D<sub>326</sub> – S<sub>327</sub> – Q<sub>328</sub> – V<sub>329</sub> – V<sub>330</sub> – R<sub>331</sub> – R<sub>332</sub> – E<sub>333</sub> – I<sub>334</sub> – A<sub>335</sub> – K<sub>336</sub> – A<sub>337</sub> – L<sub>338</sub> – S<sub>339</sub> – K<sub>340</sub> – S<sub>341</sub> ~ S<sub>324</sub> – W<sub>325</sub> – D<sub>326</sub> – S<sub>327</sub> – Q<sub>328</sub> – V<sub>329</sub> – V<sub>330</sub> – R<sub>331</sub> – R<sub>332</sub> – E<sub>333</sub> – I<sub>334</sub> – A<sub>335</sub> – K<sub>336</sub> – A<sub>337</sub> – L<sub>338</sub> – S<sub>339</sub> – K<sub>340</sub> – S<sub>341</sub> to detect diabetes mellitus and control group subjects using the ELISA developed in this research paper. After this analysis more precise conclusions could be made on the efficacy of ELISA developed in identifying ZnT8 autoantibodies in the first type of diabetes. After this analysis more precise conclusions could be made on the effectiveness of ELISA developed in identifying ZnT8 autoantibodies in the first type of diabetes. It can be assumed, that in addition to anti-ZnT8 IgG class autoantibodies, patients may also have autoantibodies of type IgA and IgM. Therefore, the second perspective would be further to improve the developed ELISA for the effective detection of these classes. By successfully combining these two perspectives the ELISA, which hopefully will be developed, can be successfully applied in clinical diagnostics.

## **TÄNUAVALDUSED**

Käesolev magistritöö valmis Tartu Ülikooli meditsiiniteaduste valdkonna bio- ja siirdemediitsiini instituudi immunoloogia osakonnas Eesti Teadusagentuuri grandi IUT20-43 "Diabeedi immuunmehhanismid" raames. Suured tänud oma juhendajale Meeme Uttile, kes andis mulle võimaluse teostada magistritöö väga huvitaval teemal ning kes juhendas mind nii laboratoorse osa läbiviimises kui ka kirjutamises. Tänan oma kaasjuhendajat Jüri Parikut heade soovitude ja tähelepanekute eest töö kirjutamisprotsessis. Samuti tänan immunoloogia osakonna juhatajat professor Raivo Uibot enda töögruppi võtmise eest ning meeldivaid laborikolleege, kes olid alati toredad ja abivalmid.

## KIRJANDUSE LOETELU

Achenbach, P., Lampasona, V., Landherr, U., Koczwara, K., Krause, S., Grallert, H., Winkler, C., Pflüger, M., Illig, T., Bonifacio, E., Ziegler, A. G. (2009). Autoantibodies to zinc transporter 8 and SLC30A8 genotype stratify type 1 diabetes risk. *Diabetologia*. 52: 1881-1888.

Anaya, J. M., Levy, R. A., Rojas-Villarraga, A. Shoenfeld, Y. 2013. Autoimmunity: From Bench to Bedside. El Rosario University Press. lk 857.

Andersen, M. K., Härkönen, T., Forsblom, C., Groop, P. H., Knip, M., Tuomi, T. (2013). Zinc transporter type 8 autoantibodies (ZnT8A): prevalence and phenotypic associations in latent autoimmune diabetes patients and patients with adult onset type 1 diabetes. *Autoimmunity*. 46: 251-258.

Andersen, M. L., Vaziri-Sani, F., Delli, A., ... Nielsen L. B. (2012). Association between autoantibodies to the Arginine variant of the Zinc transporter 8 (ZnT8) and stimulated C-peptide levels in Danish children and adolescents with newly diagnosed type 1 diabetes. *Pediatric Diabetes*. 13: 454-462.

Anderson, M. S., Bluestone, J. A. (2005). The NOD mouse: a model of immune dysregulation. *Annu. Rev. Immunol.* 23: 447-485.

Andersson, C., Vaziri-Sani, F., Delli, A. ... Larsson, H. E. (2013). Triple specificity of ZnT8 autoantibodies in relation to HLA and other islet autoantibodies in childhood and adolescent type 1 diabetes. *Pediatr Diabetes*. 14:97-105.

Andersson, C., Kolmodin, M., Ivarsson, S.-A., ... Törn C. (2014). Islet cell antibodies (ICA) identify autoimmunity in children with new onset diabetes mellitus negative for other islet cell antibodies. *Pediatric Diabetes*. 15:336-344.

American Diabetes Association. (2014). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 37: S81-S90.

American Diabetes Association. (2017). Classification and Diagnosis of Diabetes. *Diabetes Care*. 40: S11-S24.

Arvan, P., Pietropaolo, M., Ostrov, D., Rhodes, C. J. (2012). Islet Autoantigens: Structure, Function, Localization, and Regulation *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2: a007658.

Atkinson, M., Eisenbarth, G. S., Michels, A. W. (2014). Type 1 diabetes. *The Lancet*. 383: 69-82.



- Aydin, S. (2015). A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides*. 72: 4-15.
- Baekkeskov, S., Aanstoot, H., Christgau, S., Reetz, A., Solimena, M., Cascalho, M., Folli, F., Richter-Olesen, H., De Camilli, P. (1990). Identification of the 64K autoantigen in insulin-dependent diabetes as the GABA-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase. *Nature*. 347: 151-156.
- Barrett, J. C., Clayton, D. G., Concannon, P., Akolkar, B., Rich, S. S. (2009). Genome-wide association study and meta-analysis find that over 40 loci affect risk of type 1 diabetes. *Nat. Genet.* 41: 703-707
- Bearzatto, M., Naserke, H., Piquer, S., Koczwara, K., Lampasona, V., Williams, A., Christie, M. R., Bingley, P. J., Ziegler, A. G., Bonifacio, E. (2002). Two Distinctly HLA-Associated Contiguous Linear Epitopes Uniquely Expressed Within the Islet Antigen 2 Molecule Are Major Autoantibody Epitopes of the Diabetes-Specific Tyrosine Phosphatase-Like Protein Autoantigens *J Immunol.* 168: 4202-4208.
- Bonifacio, E., Lampasona, V., Bernasconi, L., Ziegler, A. G. (2000). Maturation of the humoral autoimmune response to epitopes of GAD in preclinical childhood type 1 diabetes. *Diabetes*. 49: 202-208.
- Bottazzo, G. Z., Florin-Christensen, A., Doniach, D. (1974). Islet-cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine deficiencies. *The Lancet*. 304: 1279-1283
- Bottini, N., Musumeci, L., Alonso, A., ..., Mustelin T. (2004). A functional variant of lymphoid tyrosine phosphatase is associated with type I diabetes. *Nat Genet.* 36: 337-338
- Brooking, H., Ananieva-Jordanova, R., Arnold, C., Amoroso, M., Powell, M., Betterle, C., Zanchetta, R., Furmaniak, J., Smith, B.R. (2003). A sensitive non-isotopic assay for GAD(65) autoantibodies. *Clinica Chimica Acta*. 331:55-59.
- Burkart, V.,2, Strassburger, K., Zivehe, F., Markgraf, D., Herder, C., Müssig, K., Szendroedi, J., Schloot, N., Roden, M. (2018). Inverse association of insulin antibody levels with insulin sensitivity in adults with Type 1 diabetes. *Diabet Med.* 35: 595-601.
- Buzzetti, R., Di Pietro, S., Giaccari, A., ... Bosi, E. (2007). High titer of autoantibodies to GAD identifies a specific phenotype of adult-onset autoimmune diabetes. *Diabetes Care*. 30: 932-938.

Campbell, M. J, Machin, D., Walters, S. J. 2007. Textbook for the Health Sciences, 4th Edition Wiley. lk 332.

Carmichael, S. K., Johnson, S. B., Baughcum, A., North, K., Hopkins, D., Dukes, M. G., She, J. X., Schatz, D. A. (2003). Prospective assessment in newborns of diabetes autoimmunity (PANDA): Maternal understanding of infant diabetes risk. *Genet Med.* 5: 77-83.

Chimienti, F., Devergnas, S., Favier, A., Seve, (2004). Identification and cloning of a  $\beta$ -cell-specific zinc transporter, ZnT-8, localized into insulin secretory granules. *Diabetes.* 53: 2330-2337

Chimienti, F., Devergnas S, Pattou F, ... Seve M (2006) In vivo expression and functional characterization of the zinc transporter ZnT8 in glucose-induced insulin secretion. *J Cell Sci.* 119: 4199-4206.

Chmiel, R., Beyerlein, A., Knopff, A., Hummel, S., Ziegler, A. G., Winkler, C. (2015). Early infant feeding and risk of developing islet autoimmunity and type 1 diabetes. *Acta Diabetol.* 52: 621-624.

Concannon, P., Rich, S. S., Nepom, G. T. (2009). Genetics of type 1A diabetes. *N Engl J Med.* 360: 1646-1654.

Davidson, H. W, Wenzlau, J. M, O'Brien, R. M. (2014). Zinc transporter 8 (ZnT8) and beta cell function. *Trends Endocrinol Metab.* 25: 415-424.

DeLong, T., Baker, R. L., Reisdorph, N., Reisdorph, R., Powell, R. L., Armstrong, M., Barbour, G., Bradley, B., Haskins, K. (2011). Islet amyloid polypeptide is a target antigen for diabetogenic CD4<sup>+</sup> T cells. *Diabetes.* 60: 2325-2330.

Dromey, J. A., Weenink, S. M., Peters, G. H., Endl, J., Tighe, P. J., Todd, I., Christie, M.R. (2004). Mapping of epitopes for autoantibodies to the type 1 diabetes autoantigen IA-2 by peptide phage display and molecular modeling: overlap of antibody and T cell determinants. *J Immunol.* 172(7):4084-90.

Egeŕjŕrd, L., Jensen, J. L., Bang-Berthelsen, ... Magnusson, N.E. (2009). Zinc transporter gene expression is regulated by pro-inflammatory cytokines: a potential role for zinc transporters in beta-cell apoptosis? *BMC Endocr Disord.* 9: 7.

Énéem, É., Kratzer, R., Arnoux, J. B., Barilleau, E., Hamel, Y., Marchi, C., Beltrand, J., Michaud, B., Chatenoud, L., Robert, J. J., van Endert, P. (2012). ZnT8 is a major CD8<sup>+</sup> T cell-recognized autoantigen in pediatric type 1 diabetes. *Diabetes.* 61: 1779-11784.

Engvall, E., Perlmann, P. (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*. 8: 871-874.

Erlich, H., Valdes, A. M., Noble, J., ... Moonsamy, P. (2008). HLA DR-DQ haplotypes and genotypes and type 1 diabetes risk: analysis of the type 1 diabetes genetics consortium families. *Diabetes*. 57:1084-1092

Flannick, J., Thorleifsson, G., Beer, N. L., ..., Altshuler, D. (2014). Loss-of-function mutations in SLC30A8 protect against type 2 diabetes. *Nat Genet*. 46: 357-363.

Gan, S. D., Patel, K. R. (2013). Enzyme Immunoassay and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *J Invest Dermatol*. 133: e12.

Genovese, S., Bonfanti, R., Bazzigaluppi, E., Lampasona, V., Benazzi, E., Bosi, E., Chiumello, G., Bonifacio, E. (1996). Association of IA-2 autoantibodies with HLA DR4 phenotypes in IDDM. *Diabetologia*. 1996 Oct; 39: 1223-1226.

Gorus, F. K., Goubert, P., Semakula, C., Vandewalle, C. L., De Schepper, J., Scheen, A., Christie M. R., Pipeleers, D. G. (1997). IA-2-autoantibodies complement GAD65-autoantibodies in new-onset IDDM patients and help predict impending diabetes in their siblings. The Belgian Diabetes Registry. *Diabetologia*. 40:95-99.

Gu, Y., Zhao, Z., High, H., Yang, T., Yu, L. (2017). Islet Autoantibody Detection by Electrochemiluminescence (ECL) Assay. *Methods Mol Biol*. 8: 1000531

Güven, E., Duus, K., Lydolph, M.K, Jørgensen C. S., Laursen I., Houen G. (2014). Non-specific binding in solid phase immunoassays for autoantibodies correlates with inflammation markers. *Journal of Immunological Methods*. 403: 26-36.

Han, S., Donelan, W., Wang, H., Reeves, W., Yang, L.-J. (2013). Novel autoantigens in type 1 diabetes. *Am J Transl Res*. 5: 379-392.

Jones, A. G., Hattersley A. T., (2013). The clinical utility of C-peptide measurement in the care of patients with diabetes. 30: 803-817.

Kahn, H. S., Morgan, T. M., Case, L. D., Dabelea, D. Mayer-Davis, E. J., Lawrence, J. M Marcovina, S. M. Imperatore, G. (2009). Association of Type 1 Diabetes With Month of Birth Among U.S. Youth. The SEARCH for Diabetes in Youth Study. *Diabetes Care*. 32: 2010-2015.

Karvonen, M., Viik-Kajander, M., Moltchanova, E., Libman, M., LaPorte, R., Tuomilehto, J (2000) Incidence of childhood type 1 diabetes worldwide. Diabetes Mondiale (DiaMond) Project Group. Diabetes Care. 23: 1516-1526.

Kato, K., Hamaguchi, Y., Okawa, S., Ishikawa, E., Kobayashi, K. (1977). Use of rabbit antibody IgG bound onto plain and aminoalkylsilyl glass surface for the enzyme-linked sandwich immunoassay. J Biochem. 82: 261-266.

Kawasaki, E. (2012). ZnT8 and type 1 diabetes. Endocrine Journal. 59: 531-537.

Kawasaki, E., Nakamura, K., Kuriya, G., ..., Eguchi, K. (2011). Differences in the humoral autoreactivity to zinc transporter 8 between childhood- and adult-onset type 1 diabetes in Japanese patients. Clin Immunol. 138: 146-153

Kumar, D., Gemayel, N. S., Deapen, D., Kapadia, D., Yamashita, P. H., Lee, M., Dwyer, J. H., Roy-Burman, P., Bray, G. A., Mack, T. M. (1993). North-American twins with IDDM. Genetic, etiological, and clinical significance of disease concordance according to age, zygosity, and the interval after diagnosis in first twin. Diabetes. 42: 1351-1363

Lampasona, V., Liberati, D. (2016). Islet Autoantibodies. Current Diabetes Reports. 16: 53

Lampasona, V., Passerini, L., Barzaghi, F., Lombardoni, C., Bazzigaluppi, E., Brigatti, C., Bacchetta, R., Bosi, E. (2013). Autoantibodies to harmonin and villin are diagnostic markers in children with IPEX syndrome. PLoS One. 8: e78664.

Lan, M. S., Lu, J., Goto, Y., Notkins, A. L. (1994). Molecular Cloning and Identification of a Receptor-Type Protein Tyrosine Phosphatase, IA-2, from Human Insulinoma. DNA Cell Biol. 13: 505-514

Li, S.W., Koya, V., Li, Y., Donelan, W., Lin, P., Reeves, W. H., Yang, L. J. (2010). Pancreatic duodenal homeobox 1 protein is a novel beta-cell-specific autoantigen for type I diabetes. Lab Invest. 90: 31-39.

Lindström, P., Wager, O. 1978. IgG autoantibody to human serum albumin studied by the ELISA-technique. Scand J Immunol. 7: 419-425.

Lebastchi, J., Herold, K.C. (2012). Immunologic and Metabolic Biomarkers of  $\beta$ -Cell Destruction in the Diagnosis of Type 1 Diabetes. Cold Spring Harb Perspect Med. 2: a007708

- Lemaire, K., Ravier, M. A., Schraenen, A., ... Schuit, F. C. (2009). Insulin crystallization depends on zinc transporter ZnT8 expression, but is not required for normal glucose homeostasis in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 106:14872–14877.
- Leslie, R. D., Atkinson, M. A., Notkins, A. L. (1999). Autoantigens IA-2 and GAD in Type I (insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia*. 42: 3-14.
- Leslie, R.D., Delli Castelli, M. (2004). Age-dependent influences on the origins of autoimmune diabetes: evidence and implications. *Diabetes*. 53: 3033-3040.
- Lowe, C. E., Cooper, J. D., Brusko, T., ... Todd, J. A. (2007). Large-scale genetic fine mapping and genotype-phenotype associations implicate polymorphism in the IL2RA region in type 1 diabetes. *Nat Genet*. 39: 1074-1082.
- Maahs, D. M., West, N.A., Lawrence, J.M., Mayer-Davis, E. J. (2010). Chapter 1: Epidemiology of Type 1 Diabetes *Endocrinol Metab Clin North Am*. 39: 481–497.
- Marcus, P., Yan, X., Bartley, B., Hagopian, W. (2011). LIPS islet autoantibody assays in high-throughput format for DASP 2010. *Diabetes-Metabolism Research and Reviews*. 27: 891-894.
- Masala, S., Cossu, D., Piccinini, S., Rapini, N., Massimi, A., Porzio, O., Pietrosanti, S., Lidano, R., Bitti, M. L., Sechi, L. A. (2014). Recognition of zinc transporter 8 and MAP3865c homologous epitopes by new-onset type 1 diabetes children from continental Italy. *Acta Diabetol*. 51: 577-585.
- Masala, S., Paccagnini, D., Cossu, D., Brezar, V., Pacifico, A., Ahmed, N., Mallone, R., Sechi, L. A. (2011). Antibodies recognizing *Mycobacterium avium* paratuberculosis epitopes cross-react with the beta-cell antigen ZnT8 in Sardinian type 1 diabetic patients. *PLoS One*. 6: e26931.
- Maziarz, M., Hagopian, W., Palmer, J. P., Sanjeevi, C. B., Kockum, I., Breslow, N., Lernmark, Å. (2015). Non-HLA type 1 diabetes genes modulate disease risk together with HLA-DQ and islet autoantibodies. *Gene Immun*. 16: 541-551.
- McGee, S. (2002). Simplifying likelihood ratios. *Journal of General Internal Medicine*. 17: 647-650.
- Miao, D., Guyer, K. M., Dong, F., Jiang, L., Steck, A. K., Rewers, M., Eisenbarth, G. S., Yu, L. (2013). GAD65 Autoantibodies Detected by Electrochemiluminescence Assay Identify High Risk for Type 1 Diabetes. *Diabetes*. 62: 4174-4178.

- Mitchell, R. K., Hu, M., Chabosseau, P. L., Cane, M. C., Meur, G., Bellomo, E. A., Carzaniga, R., Collinson, L. M., Li, W. H., Hodson, D. J., Rutter, G. A. (2016). Molecular Genetic Regulation of Slc30a8/ZnT8 Reveals a Positive Association With Glucose Tolerance. *Mol Endocrinol.* 30: 77-91.
- Moore, G. E., Abu-Amero, S. N., Bell, G., Wakeling, E.L., Kingsnorth, A., Stanier, P., Jauniaux, E., Bennett, S. T. (2001). Evidence that insulin is imprinted in the human yolk sac. *Diabetes.* 50: 199-203
- Morran, M. P., Casu, A., Arena, V., Pietropaolo, M. (2010). Humoral autoimmunity against the extracellular domain of the neuroendocrine autoantigen IA-2 heightens the risk of Type 1 diabetes. *Endocrinology.* 151: 2528-2537
- Morran, M. P., Vonberg, A., Khadra, A., Pietropaolo, M. (2015). Immunogenetics of Type 1 Diabetes Mellitus. *Mol Aspects Med.* 42: 42-60
- Nicolson, T. J., Bellomo, E. A., Wijesekara, N., ... Rutter, G. A. (2009). Insulin storage and glucose homeostasis in mice null for the granule zinc transporter ZnT8 and studies of the type 2 diabetes-associated variants. *Diabetes.* 58: 2073-2083.
- Niechciał, E., Rogowicz-Frontczak, A., Piłaciński, S., Fichna, M.,<sup>4</sup> Skowrońska, B., Fichna, P., Zozulińska-Ziółkiewicz, D. (2018). Autoantibodies against zinc transporter 8 are related to age and metabolic state in patients with newly diagnosed autoimmune diabetes. *Acta Diabetol.* 55: 287-294.
- Nisticò, L., Buzzetti, R., Pritchard, L. E., Van der Auwera, B., Giovannini, C. (1996) The CTLA-4 gene region of chromosome 2q33 is linked to, associated with, type 1 diabetes. *Belgian Diabetes Registry. Hum Mol Genet.* 5:1075-1080.
- Palmer, J. P., Asplin, C. M., Clemons, P., Lyen, K., Tatpati, O., Raghu, P. K., Paquette, T. L. (1983). Insulin antibodies in insulin-dependent diabetics before insulin treatment. *Science.* 222: 1337-13379.
- Payton, M. A., C. J. Hawkes, and M. R. Christie. (1995). Relationship of the 37,000- and 40,000-Mr tryptic fragments of islet antigens in insulin-dependent diabetes to the protein tyrosine phosphatase-like molecule IA-2 (ICA512). *J. Clin. Invest.* 96: 1506-1511.
- Peacock, J. L., Peacock, P. J. 2011. *Oxford Handbook of Medical Statistics.* Oxford Medical Publications. lk 544.

Pihoker, C., Gilliam, L. K., Hampe C. S., Lernmark A. (2005). Autoantibodies in diabetes. *Diabetes*. 54: 52-61

Piquer, S, Belloni, C., Lampasona V, Bazzigaluppi E, Vianello M, Giometto B, Bosi, E., Bottazzo, G. F., Bonifacio, E. (2005). Humoral autoimmune responses to glutamic acid decarboxylase have similar target epitopes and subclass that show titer-dependent disease association. *Clin Immunol*. 117:31-35.

Pound, L. D., Sarkar, S. A., Ustione, A., ... O'Brien, R. M. (2012). The physiological effects of deleting the mouse SLC30A8 gene encoding zinc transporter-8 are influenced by gender and genetic background. *PLoS ONE*. 7: e40972.

Porstmann, T., Kiessig, S.T. (1992). Enzyme immunoassay techniques. An overview. *J Immunol Methods*. 150: 5-21.

Rabin, D. U., Pleasic, S. M., Shapiro, J. A., Yoo-Warren, H., Oles, J., Hicks, J. M., Goldstein, D. E., Rae, P. M. (1994). Islet cell antigen 512 is a diabetes-specific islet autoantigen related to protein tyrosine phosphatases. *J Immunol*. 152: 3183-3188.

Rajasalu, T. (2012). Diabeedi diagnoosimine vere glükohemoglobiini taseme alusel. *Eesti Arst*. 91: 327–330.

Redondo, M. J., Jeffrey, J., Fain, P. R., Eisenbarth, G. S., Orban, T. N. (2008). Concordance for islet autoimmunity among monozygotic twins. *Engl J Med*. 359: 2849-2850.

RSR Limited. (2016). Zinc Transporter 8 (ZnT8) Autoantibody ELISA Kit – Instructions for use. *ElisaRSR™ ZnT8 Ab™*. 1-4.

Sabbah, E., Savola, K., Kulmala, P., Veijola, R., Vähäsalo, P., Karjalainen, J., Akerblom, H. K., Knip, M. (1999). Diabetes-associated autoantibodies in relation to clinical characteristics and natural course in children with newly diagnosed type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 84: 1534-1539.

Seve, M., Chimienti, F., Devergnas, S., and Favier, A. (2004). *In silico* identification and expression of SLC30 family genes: An expressed sequence tag data mining strategy for the characterization of zinc transporters' tissue expression. *BMC Genomics*. 5: 1-9.

Siraj, E. S., Homko, C., Wilson, L. A. ... Parkman, H. P. (2018). Islet Cell Associated Autoantibodies and C-Peptide Levels in Patients with Diabetes and Symptoms of Gastroparesis. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 9: 1-11.

- Skärstrand, H., Lernmark, A., Vaziri-Sani, F. (2013). Antigenicity and Epitope Specificity of ZnT8 Autoantibodies in Type 1 Diabetes. *Scand J Immunol.* 77: 21-29.
- Sladek, R., Rocheleau, G., Rung, J., Froguel, P. (2007). A genome- wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. *Nature.* 445: 881-885.
- Smidt, K., Jessen, N., Petersen A. B., Larsen, A., ... Rungby, J. (2009). SLC30A3 responds to glucose- and zinc variations in beta-cells and is critical for insulin production and *in vivo* glucose-metabolism during beta-cell stress. *PLoS One.* 4: e5684.
- Solimena, M., Folli, F., Denis-Donini, S., Comi, G. C., Pozza, G., De Camilli, P., Vicari, A. M. (1988). Autoantibodies to glutamic acid decarboxylase in a patient with stiff-man syndrome, epilepsy, and type I diabetes mellitus. *N Engl J Med.* 318: 1012–1020.
- Stadinski, B. D., DeLong, T., Reisdorph, N., ... Haskins, K. (2010). Chromogranin A is an autoantigen in type 1 diabetes. *Nat Immunol.* 11: 225-231.
- Steck, A. K, Barriga, K. J., Emery, L. M., Fiallo-Scharer, R.V, Gottlieb, P. A., Rewers, M. J. (2005) Secondary attack rate of type 1 diabetes in Colorado families. *Diabetes Care.* 28: 296-300
- Steck, A. K., Rewers, M.J. (2010) Genetics of Type 1 Diabetes. *Clin Chem.* 57: 176-185.
- Steiner, D.F., Cunningham, D., Spigelman, L., Aten, B. (1967). Insulin Biosynthesis: Evidence for a Precursor. *Science.* 157: 697-700.
- Söderbergh, A., Myhre, A. G., Ekwall, O., ... Nilsson, T. (2004). Prevalence and Clinical associations of 10 defined autoantibodies in autoimmune polyendocrine syndrome type I. *J Clin Endocrinol Metab.* 89: 557-562.
- Zhang, L., Gianani, R., Nakayama, M., Liu, E., ... Eisenbarth, G. S. (2008). Type 1 diabetes: chronic progressive autoimmune disease. *Novartis Found Symp.* 292: 85-94.
- Zhang, L., Eisenbarth, G, S. (2011). Prediction and prevention of Type 1 diabetes mellitus. *J Diabetes.* 3: 48-57
- Ziegler, A. G., Hummel, M., Schenker, M., Bonifacio, E. (1999). ICA 512, an autoantigen of type I diabetes, is an intrinsic membrane protein of neurosecretory granules. *Diabetes.* 48: 460-8.



- Tamaki, M., Fujitani, Y., Uchida, T., Hirose, T., Kawamori, R., Watada, H. (2009). Downregulation of ZnT8 expression in pancreatic  $\beta$ -cells of diabetic mice. *Islets*. 1: 124-128.
- Thermo Scientific. (2010). ELISA technical guide and protocols. TECH TIP # 65. TR0065.0. 1-14.
- Torii, S. (2009). Expression and function of IA-2 family proteins, unique neuroendocrine-specific protein-tyrosine phosphatases. *Endocr J*. 56: 639-648.
- Ustinova, J., Zusinaite, E., Utt, M., Metsküla, K., Reimand, K., Huchaiiah, V., Merits, A., Uibo, R. (2014). Development of a luciferase-based system for the detection of ZnT8 autoantibodies. *J Immunol Methods*. 405: 67-73.
- Van Belle, T. L., Coppieters, K. T, von Herrath, M. G. (2011). Type 1 diabetes: etiology, immunology, and therapeutic strategies. *Physiol Rev*. 91: 79-118.
- Van Weemen, B. K., Schuurs, A. H. (1971). Immunoassay using antigen- enzyme conjugates. *FEBS Letts*. 15: 232-236.
- Vardi, P., Ziegler, A. G., Mathews, J. H., Dib, S., Keller, R. J., Ricker, A. T., Wolfsdorf, J. I., Herskowitz, R. D., Rabizadeh, A., Eisenbarth, G. S. (1988). Concentration of insulin autoantibodies at onset of type I diabetes. Inverse log-linear correlation with age. *Diabetes Care*. 11: 736-739
- Vaziri-Sani, F., Delli, A.J., Elding-Larsson, H., Lindblad, B., Carlsson, A., Forsander, G., Ivarsson, S.A., Ludvigsson, J., Marcus, C., Lernmark, Å. (2011). A novel triple mix radiobinding assay for the three ZnT8 (ZnT8- RWQ) autoantibody variants in children with newly diagnosed diabetes. *J. Immunol. Methods*. 371: 25-37.
- Velluzzi, F., Secci, G., Sepe, V., ... Loviselli, A. (2016). Prediction of type 1 diabetes in Sardinian schoolchildren using islet cell autoantibodies: 10-year follow-up of the Sardinian schoolchildren type 1 diabetes prediction study. *Acta Diabetol*. 53: 73-79.
- Winter, W. E., Harris, N., Schatz, D. (2002). Type 1 diabetes islet autoantibody markers. *Diabetes Technol Ther*. 4: 817-39.
- Wenzlau, J. M., Juhl, K., Yu, L., Moua, O., Sarkar, S. A, Gottlieb, P., Rewers, M., Eisenbarth, G. S., Jensen, J., Davidson, H. W, Hutton, J. C. (2007). The cation efflux transporter ZnT8 (*Slc30A8*) is a major autoantigen in human type 1. *Proc Natl Acad Sci USA*. 104: 17040-17045.

Wenzlau, J. M., Liu, Y., Yu, L., Moua, O., Fowler, K. T., Rangasamy, S., Walters, J., Eisenbarth, G. S., Davidson, H. W., Hutton, J. C. (2008). A Common Nonsynonymous Single Nucleotide Polymorphism in the SLC30A8 Gene Determines ZnT8 Autoantibody Specificity in Type 1 Diabetes Diabetes 57: 2693-2697.

Wenzlau, J. M., Frisch, L. M., Gardner, T. J., Sarkar, S., Hutton, J. C., Davidson, H. W. (2009). Novel Antigens in Type 1 Diabetes: The Importance of ZnT8. Curr Diab Rep. 9:105-112.

Wenzlau, J. M., Frisch, L. M., Hutton, J. C., Davidson, H. W. (2011). Mapping of conformational autoantibody epitopes in ZNT8. Diabetes Metab Res Rev. 27: 883-886.

Wenzlau, J. M., Hutton, J. C. (2013). Novel diabetes autoantibodies and prediction of type 1 diabetes. Curr Diab Rep. 13: 608-615.

Xiao, Y., Isaacs, S. N. (2012). Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) and Blocking with Bovine Serum Albumin (BSA) – Not all BSAs are alike. Journal of Immunological Methods. 384: 148-151.

Yi, B., Huang, G., Zhou, Z. G. (2015). Current and Future Clinical Applications of Zinc Transporter-8 in Type 1 Diabetes Mellitus. Chin Med J (Engl). 128: 2387-2394

Yi, B., Huang, G., Zhou, Z. (2016). Different role of zinc transporter 8 between type 1 diabetes mellitus and type 2 diabetes mellitus. J Diabetes Investig. 7: 459-465

Yorde, D., E., Sasse, E. A. Wang, T. V., Hussam, R., Garancis, J. C. (1976). Competitive enzyme linked immunoassay with use of soluble enzyme/antibody immune complexes for labeling. I. Measurement of human choriogonadotropin. Clin. Chem. 22: 1372-1377.

Yu, L., Liu, Y., Miao, D., Wenzlau, J., Davidson, H., Hutton, J., Eisenbarth, G. S. (2010). Triple chimeric islet autoantigen IA2–ZnT8WR to facilitate islet autoantibody determination. J Immunol Methods. 353: 20-23.

## **KASUTATUD VEEBIAADRESSID**

Eesti Diabeediliit. [www.diabetes.ee](http://www.diabetes.ee). 02.01.2018

Creative Diagnostics. [www.creative-diagnostics.com/ELISA-guide.htm](http://www.creative-diagnostics.com/ELISA-guide.htm). 15.05.2018

## LISAD

### LISA 1. Kasutatud lahused

#### *1%-line lõssipulbrilahus*

1 g lõssipulbrit

100 ml PBS-Tween20-pesulahu/puhverlahust

#### *3%-line BSA-lahus*

3 g BSA-d

100 ml PBS-Tween20-pesulahu/puhverlahust

#### *10 x PBS (1 liitrini)*

80 g NaCl

2,0 g KCl

14 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>\*H<sub>2</sub>O

2,0 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

Milli-Q H<sub>2</sub>O 1 liitrini

pH=7,4

#### *Atsetaat-tsitraatpuhverlahus 0,1 M (1 liiter)*

6,56 g C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>OONa

6,2 g C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>\*H<sub>2</sub>O

368 mg EDTA-Na<sub>2</sub>

Milli-Q H<sub>2</sub>O 1 liitrini

pH=4,5

#### *Avidiinilahus*

25 µl 2 mg/ml avidiini H<sub>2</sub>O-s

10 ml Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-puhverlahust

#### *Etanoolamiin-glütsiinpuhverlahus (1 liiter)*

12,2 g etanoolamiini

18 g glütsiini

Milli-Q H<sub>2</sub>O 1 liitrini

pH=9,6

#### *Ilmutamislahus*

12 ml astsetaat-tsitraatpuhverlahust

120 µl TMB-lahust

8 µl 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

*Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-puhverlahus (50 mM) (0,5 liitrit)*

2,65 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

Milli-Q H<sub>2</sub>O 0,5 liitrini

pH=9,6

*PBS-pesulahus/puhverlahus (1 liiter)*

100 ml 10 x PBS

Milli-Q H<sub>2</sub>O 1 liitrini

pH=7,4

*PBS-Tween20-pesulahus/puhverlahus–(PBS-T) (1 liiter)*

100 ml 10 x PBS

1 ml Tween 20

Milli-Q H<sub>2</sub>O 1 liitrini

pH=7,4

*PBS-Tween 20-NaCl(0,35 M)-pesulahus/puhverlahus–(PBS-T-NaCl) (1 liiter)*

100 ml 10 x PBS

0,2 M NaCl (11,7 g)

1 ml Tween 20

Milli-Q H<sub>2</sub>O 1 liitrini

pH=7,4

*SAT1 blokeerimislahus (1 liiter)*

0,1% polüvinüülpürrolidooni M<sub>w</sub>=40 000

25% CH<sub>3</sub>OH

50% etanoolamiin-glütsiinipuhvrit

Milli-Q H<sub>2</sub>O 1 liitrini

pH=9,6

*SAT2 blokeerimislahus (1 liiter)*

0,005% želatiini hüdrolüsaati

0,025% Tween 20

25% CH<sub>3</sub>OH

50% etanoolamiin-glütsiinipuhver

Milli-Q H<sub>2</sub>O 1 liitrini

pH=9,6

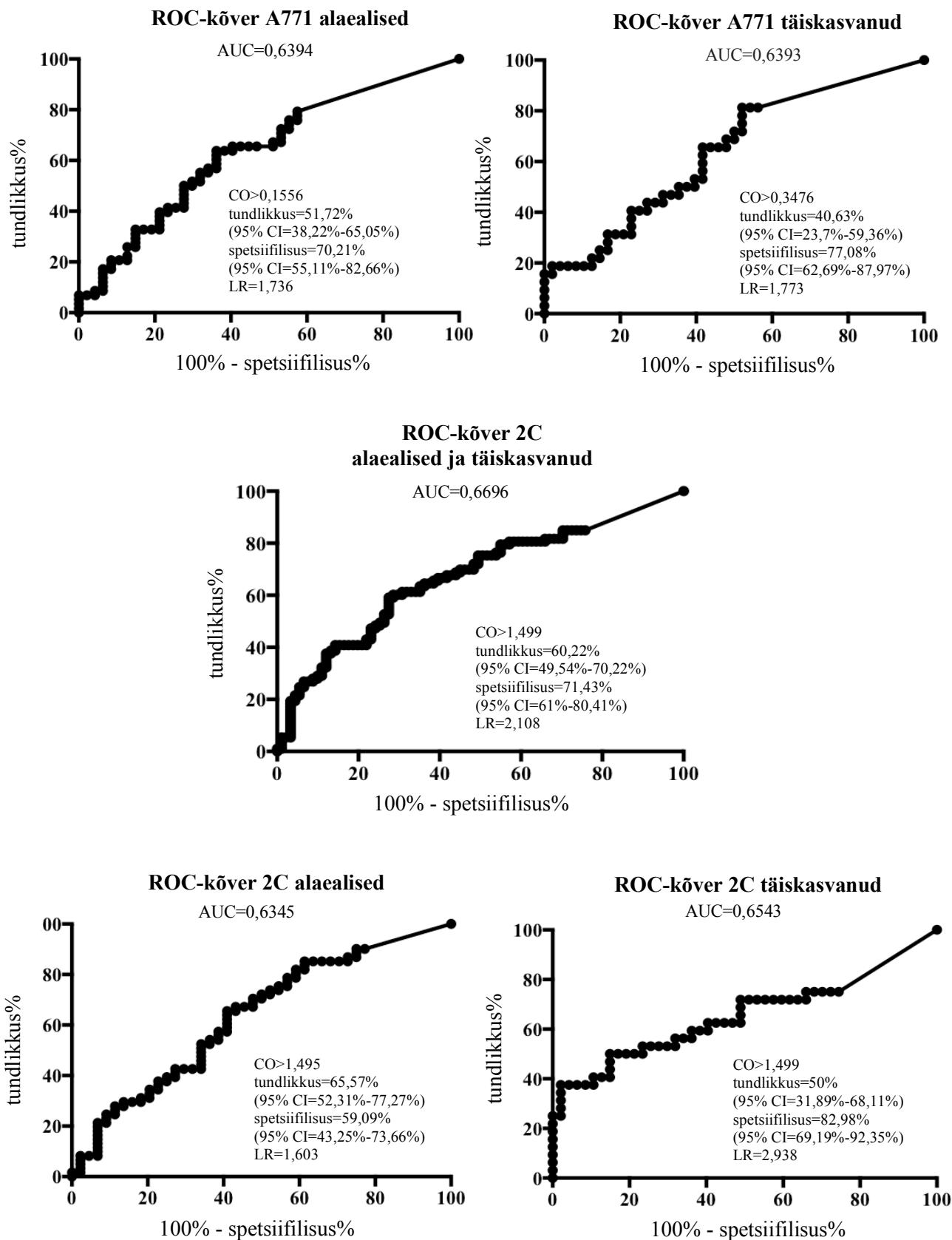
*TMB-lahus*

10 mg 3,3', 5,5'-tetrametüülbensidiini

1 ml dimetüülsulfoksiidi

## LISA 2. ROC-kõverad

ELISA A771 testis leiti CO vastavalt vanusegrupile ja ELISA 2C testi puhul ühtse grupina.



## LIHTLITSENTS

### **Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks**

Mina **Janet Tamm**  
(sünnikuupäev: 18.06.1994)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

#### **ZnT8 autoantikehad esimest tüüpi diabeedi haigetel ja nende määramine seerumis kasutades ensüümvahendatud immuunsorptsioonmeetodit,**

mille juhendajad on **Meeme Utt** ja **Jüri Parik**,

1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **01.04.2019** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
3. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 28.05.2018